

# **PAPEL DO TROMBOXANO A<sub>2</sub> NA EXCREÇÃO DE SÓDIO E ÁGUA EM RATOS COM CIRROSE BILIAR EXPERIMENTAL**

**Débora Pires de Moura**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, maio 2009

---

**Moura , Débora Pires, 1978**

**Papel do Tromboxano A<sub>2</sub> na Excreção de Sódio e Água em Ratos com Cirrose Biliar Experimental. [Vitória] 2009**

**80 p.**, 29,7 cm (UFES, M. Sc.; Ciências Fisiológicas, 2009)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Tromboxano A<sub>2</sub> 2. Cirrose Experimental 3. Excreção de Sódio e Água 5. Ratos

---

# **PAPEL DO TROMBOXANO A<sub>2</sub> NA EXCREÇÃO DE SÓDIO E ÁGUA EM RATOS COM CIRROSE BILIAR EXPERIMENTAL**

Débora Pires de Moura

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em dia/mês/ano por:

---

Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral – Orientador, UFES

---

Prof. Dr. Helder Mauad – Banca Examinadora, UFES

---

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, Banca Examinadora,  
UFES

---

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenber

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
Vitória, maio de 2009.

*O Senhor é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias. (Salmo 23: 1-6)*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel (in memoriam) e Zilda, pelas noites de orações e ensinamentos dados ao longo da minha vida.*

*Ao Fabiano, meu amado esposo, pelo seu grande amor e carinho, pelo incentivo diário, pelo estímulo e companheirismo sempre presentes.*

## **Agradecimentos**

À Deus pelo dom da vida, pela saúde, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, por estar comigo em todos os meus passos, ajudando-me todos os dias a vencer os obstáculos durante essa jornada.

Aos meus pais, Manoel Ramos de Moura (in memorian), pelo amor, carinho, compreensão e ensinamentos a mim dedicados, aos meus irmãos pelo apoio indiscriminado e aos meus amigos pela confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral pela paciência ao ensinar-me, amizade, oportunidade, dedicação e pelas lições de solidariedade.

A minha irmã Quézia pela paciência, contribuição nos experimentos e por sua amizade.

As amigas: Luciana, Aline, Daniele, Karla, Gabriela e Cristina pelo bom convívio no laboratório.

Aos meus amigos: Hélio, Diego, Camilo e Robson pelo acolhimento com carinho no laboratório.

Ao prof. Dr. Fausto pela amizade, solidariedade e contribuição nas análises histológicas hepáticas.

À prof.<sup>a</sup> Nazaré Bissoli pelos bons momentos de convívio no laboratório.

Ao professor Helder Mauad pelo apoio e exemplo de profissionalismo e solidariedade. Obrigada pelo carinho e estímulo.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os conhecimentos transmitidos, que foram de particular importância para realização deste trabalho.

A Edson Dias pela grande amizade e auxílio nos experimentos sempre solucionando os problemas.

A Fonseca pelo auxílio na secretaria da Pós-Graduação.

A amiga Márcia Regina pela amizade, contribuição na produção dos gráficos e realização das análises estatísticas.

A Fernanda pela contribuição no tratamento dos ratos e dosagens de sódio.

À Prof.<sup>a</sup> Vera Botan pela confiança em mim depositada.

A todos os colegas deste Programa de Pós-Graduação.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b>	10
<b>RESUMO</b>	12
<b>ABSTRACT</b>	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1 Animais Experimentais	28
3.2 Grupos Experimentais	28
3.3 Tratamento com Aspirina	29
3.4 Procedimentos Cirúrgicos	29
3.4.1 Cirrose Experimental	29
3.4.2 Desnervação Renal	30
3.4.3 Implantação de Cateter para Registros Hemodinâmicos	30
3.4.4 Implantação de Cateter na Bexiga para Coleta da Urina	31
3.5 Protocolo Experimental	32
3.6 Análise das Amostras	33
3.7 Preparação Histológica	33
3.8 Análise Estatística	34
<b>4 RESULTADOS</b>	
4.1 Pressão Arterial Média Basal e Frequência Cardíaca Basal	35
4.2 Ingestão de Água e Excreção Diária de Volume Urinário e Sódio	37
4.3 Tempo de Sangramento	41
4.4 Peso Corporal, Fígado e Rins	43
4.5 Sobrevida dos Animais	45
4.6 Respostas Cardiovasculares e Renais à Sobrecarga de Volume	47
4.7 Histologia Hepática	59
<b>5 DISCUSSÃO</b>	61



<b>6 CONCLUSÃO</b>	68
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES:

ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
ASR	Atividade Simpática Renal
BPM	Batimentos Por Minuto
COX	Ciclooxigenase
dL	Decilitro
EPM	Erro Padrão da Média
ExNa	Excreção de Sódio
FC	Frequência Cardíaca
FPR	Fluxo Plasmático Renal
FU	Fluxo Urinário
g	Gramas
i.p.	Via Intraperitoneal de Administração de Fármacos
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min.	Minutos
μEq	Microequivalente
μL	Microlitro
n	Número de Animais
NO	Óxido Nítrico
PAM	Pressão Arterial Média
PG	Prostaglandinas
RAE	Ramo Ascendente Espesso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNGFR	Taxa de Filtração em Único Néfron
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TPP	Total de Proteínas Plasmática
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>

## RESUMO

Os mecanismos que envolvem a relação do tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e a cirrose induzida pela ligadura dos ductos biliares em mediar à resposta excretora renal são pouco conhecidos. Nesse sentido, este estudo procurou examinar o papel do  $TXA_2$  na resposta excretora renal na cirrose experimental. Foram utilizados ratos Wistar (230g) que receberam ou não tratamento com aspirina (1,2mg/Kg por dia) (inibidor do  $TXA_2$ ) e/ou desnervados e ratos com cirrose experimental secundária à ligadura dos ductos biliares e/ou desnervação que receberam ou não tratamento com aspirina por 3 semanas. Os animais foram divididos nos grupos de ratos (n=9) controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP), não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e nos grupos de ratos experimentais (n=9): submetidos à ligadura do ducto biliar (CE), e tratados com aspirina (CE ASP), e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP). Valores acumulados de diurese e natriurese foram obtidos diariamente em gaiola metabólica. Os valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram medidos ao final do tratamento. A avaliação do papel do  $TXA_2$  na cirrose foi realizada através da utilização de aspirina por 21 dias e durante manobras de expansão volumétrica. Na manobra de expansão volumétrica, os animais foram submetidos à infusão contínua (55 $\mu$ /min) de salina por 2 horas. Após esse período de estabilização, amostras de urinas foram coletadas por um período controle (C1 e C2), período de expansão, no qual a velocidade de infusão foi aumentada ao equivalente em volume a 5% do peso corporal do animal (E1, E2, E3) e período de recuperação, onde houve o retorno à velocidade de infusão inicial, (R1, R2, R3, R4 e R5). Terminado essa fase do protocolo experimental os animais foram sacrificados e ambos os rins e fígado removidos para posterior análise histológica. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando-se da análise de variância para medidas repetidas seguida do teste de Tukey. Os resultados mostraram que os valores basais de pressão arterial foram menores nos animais com cirrose que receberam intervenção (tratados com

aspirina ou desnervados ou desnervados e tratados com aspirina) quando comparados aos grupos de animais controles que sofreram as mesmas intervenções (CE  $94 \pm 2$  mmHg; CE ASP  $94 \pm 2$  mmHg; CE DESN  $95 \pm 2$  mmHg; CE DESN ASP  $93 \pm 2$  mmHg; CTRL  $107 \pm 2$  mmHg; CTRL ASP  $106 \pm 2$  mmHg; CTRL DESN  $102 \pm 2$  mmHg; CTRL DESN ASP  $103 \pm 2$  mmHg;  $p < 0,01$ ). Os valores acumulados da diurese e natriurese mostraram que os ratos dos grupos com cirrose secundária à ligadura do ducto biliar que receberam ou não tratamento com aspirina apresentaram maior quantidade de sódio na urina e volume urinário quando comparados com os ratos dos grupos controle que receberam ou não tratamento com aspirina (CE  $253 \pm 22$  mL; CE ASP  $220 \pm 21$  mL; CTRL  $154 \pm 10$  mL; CTRL ASP  $125 \pm 8$  mL;  $p < 0,01$  e CE  $28 \pm 3,0$  mEq; CE ASP  $27 \pm 2,7$  mEq; CTRL  $23 \pm 1,2$  mEq; CTRL ASP  $16 \pm 1,2$  mEq  $p < 0,01$ ). Também quando se compara os grupos desnervados (CTRL DESN, CTRL DESN ASP, CE DESN, CE DESN ASP) com os seus respectivos grupos controles (CTRL, CTRL ASP, CE, CE ASP) a excreção de sódio na urina apresenta-se aumentada (CTRL DESN  $36 \pm 2,7$  mEq; CTRL DESN ASP  $39,38 \pm 3,0$  mEq; CE DESN  $40 \pm 3,0$  mEq; CE DESN ASP  $41 \pm 3,0$  mEq; CTRL  $23 \pm 1,2$  mEq; CTRL ASP  $16 \pm 1,3$  mEq; CE  $28 \pm 3,0$  mEq; CE ASP  $27 \pm 2,7$  mEq  $p < 0,01$ ). Além disso, o grupo CTRL ASP apresentou menores valores acumulados de excreção diária de sódio quando comparado com os ratos do grupo CTRL ( $16 \pm 1,3$  vs  $23 \pm 1,2$  mEq  $p < 0,05$ ). Os grupos de animais com cirrose tratados ou não com aspirina apresentaram diminuição nas respostas diuréticas e natriuréticas induzidas pela sobrecarga hidrossalina quando comparados aos grupos controle que receberam ou não tratamento com aspirina (CE  $42,8 \pm 17,2$   $\mu$ L/min/g; CE ASP  $51,5 \pm 16,5$   $\mu$ L/min/g; CTRL  $135,6 \pm 13,4$   $\mu$ L/min/g; CTRL ASP  $120 \pm 12,8$   $\mu$ L/min/g  $p < 0,01$  e CE  $6,9 \pm 1,7$   $\mu$ eq/min/g; CE ASP  $7,6 \pm 1,5$   $\mu$ eq/min/g; CTRL  $14,4 \pm 1,9$   $\mu$ eq/min/g; CTRL ASP  $15,7 \pm 2,2$   $\mu$ eq/min/g;  $p < 0,01$ ). A desnervação dos animais cirróticos não foi capaz de modificar a resposta diurética e natriurética dos mesmos a sobrecarga de volêmica. No entanto, houve maior excreção hidrossalina no grupo de ratos controle e desnervados que receberam tratamento com aspirina quando comparado ao grupo controle e desnervados ( $104,2 \pm 10,3$  vs  $49,3 \pm 7,3$   $\mu$ L/min/g e  $18,3 \pm 1,3$  vs  $5,7 \pm 1,4$   $\mu$ eq/min/g;  $p < 0,05$ ). Os resultados deste estudo demonstraram que o TXA<sub>2</sub> não está envolvido na excreção de água e sódio no desenvolvimento da ascite e edema que acompanha a cirrose.

## **ABSTRACT**

## 1. INTRODUÇÃO

A cirrose hepática em humanos é um processo progressivo de destruição e regeneração do parênquima hepático, caracterizado por aumento de tecido conectivo e distorção do parênquima biliar e arquitetura vascular. Essas anormalidades estruturais levam seqüencialmente a obstrução do fluxo venoso hepático, aumento de pressão na veia porta e anastomose porto-sistêmica que resultam em prejuízo das funções de síntese e degradação hepatocelular. Essas alterações reduzem a síntese de albumina, fatores de coagulação, uréia, substrato da renina e outros produtos metabólitos. Ainda são observadas redução na conjugação da bilirrubina e redução na degradação de vários hormônios, incluindo aldosterona (Millard-Sadle and Wright, 1979). Este distúrbio na função hepática pode está associado com alterações características na função renal, incluindo prejuízo na excreção de sal e água e, na cirrose avançada, redução na filtração glomerular. Já o defeito no transporte de sódio parece ocorrer prematuramente na cirrose, como demonstrado por Naccarato e colaboradores (1981), em pacientes cirróticos que nunca desenvolveram ascite ou edema, mas que, no entanto, apresentam excreção de sódio reduzida em resposta a expansão de volume. Na verdade, pacientes cirróticos com ascite podem apresentar variações na taxa de filtração glomerular, podendo estar baixa, normal ou até mesmo alta (Papadakis and Arieff, 1987).

Evidências experimentais indicam que a hipertensão intra-hepática conseqüentemente ao bloqueio do fluxo venoso hepático é o distúrbio primário responsável pelo início na retenção de sódio na cirrose (Levy, 1974; Campbell e cols., 1982). Levy (1974) demonstrou que obstrução seletiva do fluxo venoso hepático por infusão intra-hepática de histamina ou ligação cirúrgica da veia hepática em cães, causam redução dramática na excreção urinária de sódio e preservação da taxa de filtração glomerular. Essas alterações na função renal são independentes de mudanças na pressão venosa portal, anastomose porto-sistêmica, acumulação de bilirrubina ou outros distúrbios na função hepática. Para demonstrar a importância da

hipertensão intra-hepática, cães com cirrose experimental secundária à ligadura dos ductos biliares em associação com anastomose porta-cava (Unikowsky e cols., 1983). Nesse modelo, a cirrose ocorreu dentro de 6 semanas e a anastomose porto-cava permaneceu intacta em alguns animais e parcialmente ocluídas em outros. Aqueles com oclusão parcial retiveram sódio e desenvolveram ascite com administração da DOCA e sobrecarga de sal, já os demais, com anastomose íntegra e mesmo tratamento, escaparam da DOCA induzir retenção de sal e desenvolvimento de ascite. Os autores concluíram que a normalização da pressão intra-hepático evitou a retenção do sódio. A hipertensão intra-hepática poderia levar a retenção de sódio por um ou mais mecanismos, onde a hipertensão intra-hepática por si só agiria como um estímulo aferente para sinalizar a retenção de sódio, independente de qualquer perturbação, interferindo na função circulatória. Alternativamente, ou em adição, a percepção de redução de enchimento do componente arterial da circulação serviria como um estímulo aferente para retenção renal de sódio.

Para hipertensão intra-hepática agir como estímulo primário na retenção de sódio, é necessário a utilização de receptores de volume intra-hepáticos. Em particular, mecanismos que respondem especificamente ao aumento na pressão venosa intra-hepática, como o aumento da atividade dos nervos simpáticos aferentes (Andrews and Palmer, 1967, Kostreva e cols., 1980; Nijima, 1977). Os relés para esses impulsos consistem em dois plexos nervosos autonômicos hepáticos, um que trafega junto com a artéria hepática e outro com a veia porta (Pick, 1970). Ambos são compostos de ramos dos nervos vago e fibras simpáticas. Kostreva e colaboradores (1980) delinearam a via neural reflexa composta desses elementos que liga a congestão venosa hepática com o aumento na atividade simpática renal e cardiopulmonar reflexa. Oclusão da veia cava inferior ao nível de diafragma, que está associada com aumento da pressão venosa hepática, portal e renal, resulta em grande aumento na atividade nervosa hepática aferente e na atividade renal e cardiopulmonar aferentes. A vagotomia ou frenectomia não alteram esses reflexos, sugerindo que a via autonômica simpática é que está envolvida. Levy e Wexler (1987) mostraram que a desnervação hepática em cães com constrição da veia cava aumenta o sódio urinário. A função de um sensor intra-hepático distinto que

especificamente detecta a concentração de sódio está substancialmente aumentada em ratos cirróticos por tetracloreto de carbono a despeito da ausência de edema ou ascite, confirmando que essa via pode ser inibida por lesão no parênquima hepático (Lopez-Novoa e Martinez-Maldonado, 1982). Esses mecanismos implicados na retenção de sódio parecem ser consequência de distúrbios da função hepática, independentes de informações vindas de sensores de volume de região extra-hepáticas.

A transformação nodular deve ser lembrada pela sua importância na patogenia da hipertensão portal, devido à compressão que os nódulos regenerativos impõem entre si e às demais estruturas localizadas em sua periferia ou para aí deslocadas, como as veias eferentes, que se estreitam e se angulam (Gentilini e cols., 1999, Franco e cols., 1979). Somam-se a isso a fibrose pericentral e parassinusoidal como causas primordiais dessa complicação. Suas consequências são desastrosas, com o aparecimento de desvios circulatórios, desenvolvendo-se circulação colateral, superficial e profunda, no sentido de desviar sangue do território hipertenso à circulação sistêmica, e esplenomegalia, de natureza congestivo-esclerosa, contribuindo fundamentalmente para a formação da ascite (Gentilini e cols., 1999; Franco e cols., 1979).

Fases avançadas da cirrose acompanham-se de vasodilatação, queda da resistência vascular periférica e baixa pressão arterial, apesar de um aumento do volume plasmático, com aumento do fluxo sanguíneo em vários territórios, especialmente pele e músculos, podendo ainda se formar circuitos arteriovenosos, principalmente subcutâneos e telangiectasias. Essas alterações correlacionam-se com vários distúrbios circulatórios, dentre eles a hipotensão arterial e o estado circulatório hiperdinâmico, com aumento do débito cardíaco e da velocidade circulatória, que somados a seqüestração esplâncnica de parte considerável da volemia, explicam a queda do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular, resultando na contribuição para a formação da ascite e juntos a vários outros mecanismos, na excessiva reabsorção tubular de sódio (Pena JC 1995; Schrier e cols., 1988, Moore K, 1997). O próprio desequilíbrio glómerulo-tubular decorrente do menor volume filtrado, o estímulo ao aparelho justaglomerular, com ativação do sistema renina-angiotensina-



aldosterona e do hormônio anti-diurético, com estimulação de receptores sensíveis à queda de volume e/ou pressão sistêmica fazem parte desses outros mecanismos que o organismo utiliza para diminuir a natriurese (Voigt e cols., 1999; Dibona e Sawin, 1991 e 1995) .

Na cirrose hepática há um aumento na produção vascular de NO, o que explicaria em parte a vasodilatação arterial periférica (Ros J. e cols., 1995; Guarner e cols., 1993). Estudos experimentais e clínicos mostraram que na cirrose o aumento da sensibilidade pressórica sistêmica e reposta vasoconstritora renal é atenuando à inibição do NO, além da correção do estado circulatório hiperdinâmico, aumento a filtração glomerular, aumento na excreção hidrossalina e diminuição da ativação neuro-humoral (Forrest e cols., 1995; Ros J. e cols., 1995; Niederberger e cols., 1995).

Já são bem estabelecidas as evidências de que os nervos renais contribuem para o controle da função renal e da homeostasia, em condições normais e patológicas, como na cirrose hepática. Os estudos anatômicos de Mitchell (1950) revelaram que os nervos renais têm origem difusa, estendendo-se do nervo esplânico torácico superior passando pelo simpático lombar ao plexo hipogástrico que envolve a bifurcação aórtica na região pré-sacral. Os nervos renais são nevos mistos que contêm fibras aferentes e eferentes. São descritas duas classes aferentes renais: os mecanorreceptores que monitorizam as mudanças de pressão hidrostática no rim e os quimiorreceptores que são afetados por isquemia (Recordati e cols., 1980). A inervação eferente renal é composta por fibras simpáticas pós-ganglionares que tipicamente exercem seus efeitos através da liberação de noradrenalina em receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 nas membranas celulares pós-sinápticas. A inervação simpática é dirigida para as arteríolas glomerulares aferentes e eferentes, para os túbulos renais (proximal e distal), para o ramo ascendente da alça de Henle e para o sistema justaglomerular (DiBona, 1989). Alterações na atividade do nervo simpático renal eferente produzem mudanças significativa no fluxo sanguíneo renal, na taxa de filtração glomerular, na liberação de renina e na reabsorção de sódio e água. Estudos experimentais mostraram que as alterações em tais parâmetros são proporcionais à frequência de estimulação do nervo simpático renal, observando-se

que, dependendo da magnitude do estímulo, pode ocorrer aumento da reabsorção de sódio e água ao longo do néfron sem alterações da hemodinâmica renal (DiBona e Sawin, 1983; DiBona, 1985; DiBona, 1986). Estímulos com frequências mais altas (maiores que 2,0 Hz) mostraram causar aumento na resistência renal e redução no fluxo sanguíneo renal, efeito esse mediado predominantemente por receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 (DiBona, 1985).

A participação dos nervos simpáticos renais na regulação do balanço de sódio foi evidenciada por alguns autores em animais acordados durante alterações agudas e crônicas no sódio corporal total (Rogenes e cols., 1982; Szalay e cols., 1986). Estudos experimentais mostraram que a redução na atividade simpática renal eferente, mediada pela expansão de volume, é fundamental na resposta excretora renal à sobrecarga de volume e que a desnervação renal prévia atenua tais respostas, diurética e natriurética (DiBona e Sawin, 1985; Morita e Vatner, 1985; Peterson e cols., 1988).

Quando a atividade do sistema nervoso simpático é agudamente aumentada, algumas estruturas recebem suprimento simpático maior do que outras. Isso tem sido observado em várias situações experimentais nas quais aumentos súbitos da atividade simpática produzem vasoconstrição desproporcionalmente maior no leito vascular renal do que em outros leitos vasculares (Vatner e cols., 1971; Katholi e cols., 1979). Esses dados favorecem a possibilidade de que nos estados em que a atividade simpática é cronicamente aumentada também haveria um tônus simpático desproporcionalmente maior para os rins do que para outros órgãos facilitando a retenção de sódio devido à vasoconstrição renal, o aumento na liberação de renina pelas células justaglomerulares, com aumento na formação de angiotensina II, e aumento do efeito direto dos nervos simpáticos nos túbulos renais (DiBona, 1989).

Expansão volêmicas agudas produzem efeitos hemodinâmicos renais como consequência da mobilização de mecanismos neurais, humorais e locais no sistema circulatório. De maneira geral, acredita-se que a adaptação da circulação ocorre por supressão de mecanismos vasoconstritores tônicos sistêmicos ou locais, ou por

ativação de mecanismos dilatadores locais dos vasos produzindo diminuição do tônus vascular e conseqüentemente diminuição na resistência vascular. Desse modo, durante expansão volêmica ocorre aumento do débito cardíaco e prevenção do aumento esperado na pressão arterial devido à supressão de mecanismos vasoconstritores e retentores de sódio e água, como a vasopressina e na ativação de mecanismos vasodilatadores como os peptídeo natriurético atrial e das prostaglandinas (Brennan e cols 1971; Goetz e cols., 1975).

Estudos demonstram que a redução na atividade simpática renal eferente, mediada pela expansão de volume, é fundamental na resposta excretora à sobrecarga de volume e que a desnervação renal prévia atenua tal resposta diurética e natriurética (DiBona e Sawin, 1985; Morita e Vatner, 1985; Peterson e cols., 1988). A pesquisa realizada por Patel (1991) mostrou o papel da vasopressina nas respostas diurética e natriurética à expansão de volume ao demonstrar que o bloqueio dos receptores de vasopressina reduz o aumento na natriurese e diurese, sugerindo com esses resultados que a vasopressina também tem um importante papel na resposta reflexa à expansão de volume. O papel do peptídeo natriurético atrial nas respostas natriurética e diurética à expansão de volume é mostrada em vários estudos em que a resposta excretora e a circulação de ANP aumenta nessa condição. Schwab e colaboradores (1986) demonstraram que a excisão do átrio direito atenua a liberação de ANP e conseqüentemente a excreção de sódio durante expansão de volume. A liberação do ANP é estimulada quando há um hiperestiramento dos átrios na expansão volêmica e o mesmo atua promovendo aumento no fluxo urinário e na excreção de sódio via aumento da taxa de filtração glomerular e redução da reabsorção tubular de sódio e água (Huang e cols., 1985).

Assim como em alguns estados clínicos como a síndrome nefrótica e a insuficiência cardíaca que se caracterizam por retenção de sódio e água e conseqüentemente formação de edema, na cirrose hepática existem anormalidades nos mecanismos de controle circulatório e de volume que induzem respostas em diversos sistemas neuro-humorais capazes de influenciar a função renal, cujos efeitos finais resultam em retenção de sódio e água durante a instalação do quadro da doença. Dentre esses sistemas neuro-humorais, estão o sistema nervoso simpático e a

vasopressina. Investigações prévias sugerem aumento da atividade dos nervos simpáticos renais em pacientes com cirrose hepática (DiBona, 1984; Zambraski e DiBona, 1996). Em adição a esse aumento na atividade dos nervos simpáticos renais, que também está presente na síndrome nefrótica, a concentração plasmática de vasopressina parece encontrar-se também aumentada, provavelmente refletindo decréscimo efetivo do volume sanguíneo. Além disso, o aumento da atividade da aldosterona na cirrose, seja pela ativação do aparelho justaglomerular, seja por redução de sua inativação hepática, e a produção aumentada dos níveis plasmáticos da vasopressina, que ocorre tanto pela diminuição da pressão oncótica sanguínea devido à hipoalbuminemia, quando por estímulo de receptores sensíveis à queda da volemia efetiva, contribuem também de forma considerável para a retenção de sódio durante as etapas de desenvolvimento da cirrose hepática (Lieming e cols., 2000; Moore., 1997).

A contribuição do aumento na atividade dos nervos renais para a retenção de sódio e água no edema é evidente, uma vez que a simpatectomia química por bloqueio anestésico bilateral lombar resulta em diurese e natriurese naqueles pacientes com cirrose hepática e ascite, com retenção de sódio, função renal reduzida e ausência de resposta natriurética à expansão de volume (DiBona, 1984; Zambraski e DiBona, 1996). Múltiplos são os mecanismos centrais e periféricos que contribuem para o aumento atividade dos nervos simpáticos renais (ASR). Dentre eles, o barorreflexo hepatorenal, que ocorre devido à alta pressão sinusoidal intra-hepático estimulando barorreceptores intra-hepáticos, resultando no aumento da ASR (DiBona e Sawin, 1995). A ação da Angiotensina II, que se encontra em níveis elevados, em determinado sítio do SNC pode também contribuir para aumentar a ASR em algumas situações fisiopatológicas, como na cirrose (Reide IA, 1992; Gentilini e cols., 1999; Pena JC, 1995; Voigt e cols., 1999). Nesse sentido, a administração intracerebroventricular de um antagonista dos receptores da Angio II tipo AT1 produz queda transitória da ASR em ratos com ligadura do ducto biliar comum, recebendo agudamente solução salina isotônica via endovenosa, em volume igual a 10% do seu peso corporal, porém não induz a resposta natriurética, devido ao efeito hipotensor da droga (Voigt e cols., 1999). Portanto, manobras que diminuem a atividade dos nervos simpáticos renais e conseqüente aumento na natriurese e

diurese, apresentam efeitos benéficos sobre a função renal, e tais efeitos poderiam contribuir para a melhoria do edema no quadro da cirrose.

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que na cirrose hepática há ativação de mecanismos vasoconstritores para compensar a queda da resistência vascular promovendo a maior ativação intrarrenal de vasoconstritores (TXA<sub>2</sub>) e redução de vasodilatadores (PGE<sub>2</sub>). O tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) é derivado, juntamente com as prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico quando metabolizado pela via da ciclooxigenase. É produzido predominantemente a partir das plaquetas atuando sobre receptores TP que apresentam duas isoformas (TP $\alpha$  e TP $\beta$ ). Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados à proteína-G. O tromboxano pode ativar tanto a via da fosfolipase C quando acoplado a proteína Gq, quanto à via da adenilato ciclase quando acoplado a proteína Gs e provocar a vasoconstrição e a agregação plaquetária, tendo também uma potente ação antinatriurética (Clarke e cols., 1991; Hennekens., 1997; Papanicolaou e cols., 1985; Hirata e cols., 1991; Nakahata e cols., 1989).

As drogas capazes de inibir a atividade da ciclooxigenase (COX) podem inibir a produção do TXA<sub>2</sub>, também inibem a produção dos outros prostanóides, como as PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (Hennekens CH e cols., 1997). Os grupos de drogas que classicamente tem essa propriedade são os anti-inflamatórios não-esteroidais (Ranger e cols., 1999). Existem duas isoformas dessa enzima, ciclooxigenase 1 e 2 (designadas como COX-1 e COX-2) (Smith, 1992). As duas isoformas compartilham de propriedades enzimáticas semelhantes, mas diferenças marcantes em relação à expressão e a regulação celular. A COX-1 é expressa de maneira constitutiva pela maioria das células dos vasos sanguíneos, estômago e rins, participando de vários processos fisiológicos. Por outro lado, a COX-2 praticamente não é detectada em condições normais na maioria dos tecidos, porém pode ser induzidos por alguns fatores séricos, citocinas e fatores de crescimento, sendo a principal isoforma envolvida na produção de prostanóides que mediam a resposta inflamatória. Os prostanóides são liberados por vários estímulos químicos, mecânicos, térmicos e outros e contribuem significativamente para a patogenia dos sinais e sintomas da inflamação como edema, dor e febre (Moncada e cols., 1978). Hoje em dia estão

claro que os antiinflamatórios não-esteróides (AINES) exercem seus efeitos terapêuticos por inibir a ciclooxigenase e, conseqüentemente, suprimir a síntese da PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> e de todos os compostos que lhes seguem.

No tecido renal a via da ciclooxigenase é a mais importante via de metabolização do ácido araquidônico (Navar e cols., 1996; McGiff e cols., 1999; Imig e cols., 2000). Tanto a COX-1 como a COX-2 metabolizam o ácido araquidônico gerando prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (prostanóides) que contribuem para regulação da hemodinâmica renal através da regulação do tônus vascular renal, filtração glomerular e mecanismos de reabsorção tubular de Na<sup>+</sup> e água no ramo ascendente espesso (ERA). (Currie e cols., 1984.; Navar e cols., 1996; Palmer e cols., 1995). Os rins de ratos, camundongos e humanos, expressam constitutivamente as duas isoformas da COX. A COX-1 parece ser expressa uniformemente e mais amplamente em todas as espécies nos vasos renais, glomérulos, células medulares intersticiais, células mesangiais, ramo ascendente espesso medular (RAEM), ductos coletores da medula externa (DCME) e ductos coletores da medula interna (DCMI). Já a expressão da COX-2 no rim é mais restrita e menos intensa em condições fisiológicas e exibem algumas diferenças na localização entre as espécies. A distribuição intrarenal da COX-2 em ratos inclui células mácula densa, ramo ascendente espesso cortical (RAEC), RAEM, DCMI, células medulares intersticiais e células mesangiais. (Yang e cols., 1998; Harris e cols., 1994; Komhoff e cols., 1997).

Nas plaquetas, a ação da ciclooxigenase leva à síntese do TXA<sub>2</sub>, ao passo que no endotélio vascular, conduz à síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e nos macrófagos resulta, principalmente, na síntese de PGE<sub>2</sub> (Clarke e cols., 1991; Hennekens e cols., 1997; Pawar e cols., 1998). A aspirina faz parte grupo de fármacos antiinflamatório não-esteróides, sendo, portanto, um AINE. A aspirina inibe a ciclooxigenase, atuando principalmente sobre a COX-1, através de acetilação de um radical de serina em seu sítio inativando de forma irreversível a ciclooxigenase plaquetária (Pedersen and FitzGerald, 1984; Weksler e cols., 1983). Isso reduz tanto a síntese de TXA<sub>2</sub> nas plaquetas quanto à síntese de prostaciclina no endotélio vascular, alterando o equilíbrio entre esses dois prostanóides. Entretanto, a despeito da atividade anti-ciclooxigenase da aspirina, a prostaciclina é produzida continuamente

nas células endoteliais, pois estas podem ressintetizar a enzima dentro de poucas horas, ao passo que as plaquetas são incapazes de fazê-lo. Conseqüentemente, a síntese de  $\text{TXA}_2$  só é recuperada após substituição das plaquetas afetadas (Pedersen and FitzGerald., 1984; Pawar e cols.,1998). Além disso, são necessárias doses mais alta de aspirina para inibir a ciclooxigenase no endotélio vascular do que nas plaquetas, particularmente, quando administrada por via oral. Isso se deve ao fato de as plaquetas serem expostas à aspirina no sangue porta, antes de sua deacetilação pela ação de estereases no fígado, enquanto, o efeito vascular sistêmico é parcialmente protegido por esse metabolismo pré-sistêmico da aspirina (Clarke e cols., 1991; Hennekens e cols., 1997; Pedersen and FitzGerald, 1984; Pawar e cols.,1998).

Alguns estudos clínicos mostraram que o tratamento com baixas doses de aspirina é eficaz para a prevenção de doenças cardiovasculares, como Infarto Agudo do Miocárdio em pacientes com angina instável e os ataques isquêmicos transitórios, e suas complicações, devido a essa seletividade pelo  $\text{TXA}_2$  (Hennekens e cols., 1997, Pawar e cols.,1998 e Weksler e cols.,1983). Nesses casos, são considerados de baixa dosagem o tratamento para adulto com 20mg a 80mg por dia. (Hennekens e cols., 1997, Pawar e cols.,1998 e Weksler e cols.,1983). Em estudo clínico realizado por Weksler e colaboradores (1983) em pacientes com aterosclerose mostrou que em torno de 12 a 16 horas após a administração de 80mg de aspirina foi capaz de inibir a ação do  $\text{TXA}_2$  plaquetário em 95%, enquanto, que a produção de prostaciclina no tecido aórtico removido desses pacientes foi de apenas 38%.

Um aspecto importante que acontece na cirrose hepática e que vêm merecendo atenção são as alterações no teor renal de prostanóides, com redução de vasodilatadores, como a prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), e excesso dos vasoconstritores, como o  $\text{TXA}_2$  (Alvariz FG., 1993; Arroyo e cols., 1986; Zipser e cols, 1983). É sabido, por exemplo, que os prostanóides vasodilatadores são mediadores importantes nos mecanismos que controlam a hemodinâmica renal (Chatziantoniou and Arendshorst, 1992, DiBona GF, 1986, Range, 1999). Tais substâncias mantêm o fluxo sanguíneo renal quando há aumento da atividade dos sistemas vasoconstritores em algumas condições clínicas e experimentais, como na insuficiência cardíaca congestiva,

isquemia renal, hipovolemia e a própria doença hepática crônica (Chatziantoniou and Arendshorst, 1992 e DiBona GF, 1986). A inibição da biossíntese de prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) e de outras prostaglandinas com ações vasodilatadoras mostrou diminuição do fluxo plasmático renal em ratos cirróticos (Ros J e cols.,1995). Em ratos pré-tratados com indometacina, um agente anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) inibidor relativamente seletivo para a COX-1, injeções intrarrenais de Angio II, norepinefrina e de um agonista do  $TXA_2$  promovem diminuição transitória do fluxo sanguíneo renal e aumento da resistência vascular renal. A respeito do agonista do  $TXA_2$ , a diminuição do fluxo sanguíneo renal é de 25% em relação aos níveis basais. Já injeções intrarrenais de  $PGE_2$ ,  $PGI_2$ , análogo de  $PGE_2$  e  $PGI_2$  promovem aumentos de, em média, 10%, 5%, respectivamente. Nesse mesmo estudo, quando se associa prostanóides vasodilatadores com vasoconstritores, a diminuição do fluxo sanguíneo renal é menor que quando administrado somente o agente vasoconstritor (Chatziantoniou and Arendshorst, 1992). Isso demonstra que há interação entre essas substâncias e suas ações. Silldorff e colaboradores (2002) demonstraram que o  $TXA_2$  também pode mediar parcialmente à ação vasoconstritora da Angio II em determinados pontos da vasa recta medular renal. Além disso, a administração de imidazol, um inibidor da tromboxano síntase, numa dose que não há diminuição da síntese dos outros prostanóides, aumenta significativamente a razão de excreção de sódio em ratos normais (Papanicolaou e cols.,1985).

O papel do aumento renal da produção  $TXA_2$  na modulação da hemodinâmica renal e retenção de sódio e água em pacientes com cirrose hepática e ascite tem sido discutido. Laffi e colaboradores (1992) mostraram que o bloqueio dos receptores  $TXA_2$  com antagonista ONO- 3708 promoveu um aumento na diurese e do fluxo plasmático renal, sugerindo que o  $TXA_2$  renal exerce função de modular o manobra da água em pacientes com cirrose e ascite. Entretanto, Sarleno e colaboradores (1993) mostraram que o bloqueio do  $TXA_2$  por imidazole salicilato (750mg/dia), um anti-inflamatório não-esteroidal, porém numa dose que não inibe o efeito das prostaglandinas síntase em pacientes com cirrose descompensada não foi capaz de afetar a função renal ou inibir a produção de prostaglandina renal em condição basal. Assim, mesmo diante da dificuldade da compreensão da relação entre a



cirrose hepática e o tromboxano  $A_2$  na resposta excretora renal existem estudos que tem mostrado que os níveis renais de  $TXA_2$  encontram-se aumentado, levando especialmente, à disfunção renal no transtorno hepático crônico. (Zipprich e cols., 1990; Zipser e cols., 1983; Fan JG e cols., 2004)

Mesmo assim, ainda existem poucos estudos clínicos e experimentais que correlacionam esse prostanóide e a cirrose. E finalmente, buscando de alguma forma contribuir para responder a significativa questão referente ao papel do tromboxano  $A_2$  no controle da função renal é que nos propusemos a realizar a pesquisa em questão.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

- O presente trabalho tem por objetivo verificar a participação do tromboxano A<sub>2</sub> nos mecanismos envolvidos na retenção de sódio e água em ratos com cirrose experimental, por meio de ligadura dos ductos biliares.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Avaliar a participação relativa da inibição do tromboxano A<sub>2</sub>, através do uso da aspirina, sobre os mecanismos de adaptação da natriurese e diurese.
- Estudar simultaneamente a participação dos nervos simpáticos renais na diurese e natriurese diária e induzida pela sobrecarga de volume.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais**

Os experimentos foram realizados em ratos machos, Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com cerca de 230g provenientes do biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos foram mantidos em ambiente com luz, temperatura e umidade controladas.

#### **3.2 Grupos Experimentais**

Os ratos foram divididos em dois grandes grupos, aquele em que os animais foram submetidos à ligadura do ducto biliar (cirrose experimental) e aquele em que os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura do ducto biliar (animais controle). Ambos os grupos foram submetidos aos experimentos agudos e crônicos. Cada um destes grupos foi dividido em subgrupos (n=9), conforme o tratamento recebido por cada animal, e como abaixo esquematizado.

##### **1. Animais Controle:**

- a) Não receberam tratamento com aspirina (CTRL).
- b) Não receberam tratamento com aspirina e submetidos à desnervação dos nervos simpáticos renais (CTRL DESN).
- c) Receberam tratamento com aspirina (CTRL ASP).
- d) Receberam tratamento com aspirina e submetidos à desnervação dos nervos simpáticos renais (CTRL DESN ASP).

## 2. Animais com Cirrose Experimental por Meio da Ligadura dos Ductos Biliares:

- a) Não receberam tratamento com aspirina (CE).
- b) Não receberam tratamento com aspirina e submetidos à desnervação dos nervos simpáticos renais (CE DESN).
- c) Receberam tratamento com aspirina (CE ASP).
- d) Receberam tratamento com aspirina e submetidos à desnervação dos nervos simpáticos renais (CE DESN ASP).

### 3.3 Tratamento com Aspirina

Os ratos (controle e submetidos à ligadura do ducto biliar) foram colocados em gaiolas metabólicas individuais com livre acesso à comida e à água e mantidos em sala com temperatura constante e ciclo claro escuro de 12 horas. O tratamento com aspirina (ácido acetilsalisílico) foi realizado por um período de 21 dias utilizando uma dose diária de 1,2 mg/Kg, por gavagem (Pedersen and FitzGerald, 1984).

### 3.4 Procedimentos Cirúrgicos

#### 3.4.1 Cirrose Experimental

Para a produção da cirrose experimental, utilizamos a técnica descrita por Franco e colaboradores (1979), na qual, sob anestesia pelo hidrato de cloral (40mg/100g), os ratos foram submetidos à laparotomia mediana para acesso ao ducto biliar comum. Utilizando-se de um fio de seda 3-0, foram feitas duas ligaduras para secção do ducto entre as mesmas. Após a sutura em dois planos, os animais receberam injeção intramuscular de penicilina G benzatina(30.000UI). Os animais controle

sofreram todos os procedimentos cirúrgicos, porém sem a ligadura do ducto biliar comum.

#### 3.4.2 Desnervação renal

No sentido de se verificar se a atividade dos nervos simpáticos renais, com sua ação retentora de sódio, poderia influenciar na evolução da morbidade da síndrome cirrótica, em um grupo a parte, previamente à ligadura do ducto biliar, os animais sofreram desnervação bilateral dos nervos simpáticos renais. Sob anestesia com hidrato de cloral ( $400\text{mg kg}^{-1}$ , ip), realizou-se uma incisão bilateral nos flancos e com auxílio de uma lupa (World Precision Instruments 13301, FI, USA), procedeu-se a separação das fibras nervosas dos vasos renais. Os nervos e seus ramos foram cortados e os vasos foram banhados com uma solução de fenol a 10% em álcool absoluto a fim de se destruir qualquer fibra nervosa remanescente, como descrito anteriormente por DiBona e Sawin (1983). Este procedimento causa completa desnervação simpática, uma vez que já foi demonstrado pelos autores acima que a desnervação renal previne a resposta vasoconstritora renal, previne a antinatriurese induzida, por exemplo, pelo estresse ambiental e também previne a antinatriurese em alguns estados fisiopatológicos como na cirrose. Nestas condições, os níveis renais de catecolaminas são reduzidos a valores não detectáveis como demonstrados em análise por histofluorescência por Voingt, Jones e Dibona (1999), nos estudo prévio de Souza (1999), em nosso laboratório. Depois de completada a desnervação renal, a incisão no flanco foi fechada através de suturas nas camadas musculares e na pele e terminado o ato cirúrgico, os animais receberam injeção intramuscular de penicilina G benzatina (30.000 UI).

#### 3.4.3 Implantação de Cateteres para Registros Hemodinâmicos

Os registros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos por meio de cateter implantado na aorta abdominal via artéria femoral

esquerda. A veia femoral esquerda também foi cateterizada para que fosse possível a infusão de solução isotônica de salina. Os cateteres foram confeccionados utilizando-se um tubo de polietileno PE-50 (Clay Aams, Parsippany, EUA) de 15 cm de comprimento, unidos a um PE-10 de 5 cm de comprimento por meio de aquecimento sob mandril. Sob influência anestésica do hidrato de cloral os cateteres foram implantados através de manobras cirúrgicas que consistiam de uma incisão na região inguinal em direção ao feixe vâsculo-nervoso. Após o isolamento da artéria foi introduzida a extremidade do PE-10, previamente heparinizado (40UI/ml). A outra extremidade do cateter foi dirigida, por meio de um trocáter, sob a pele do dorso do animal até a região mediocervical posterior e fixadas à pele por um fio de sutura, sendo o mesmo procedimento adotado para a cateterização venosa.

As medidas hemodinâmicas de PAM e FC foram feitas conectando-se os animais acordados (via cateter arterial) a um transdutor de pressão (Spctramed-Statham, P23XL, USA) acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (Biopac system, MP100, Santa Bárbara, CA, EUA).

#### 3.4.4 Implantação de Cateter na Bexiga para Coleta da Urina

A seguir (após cerca de 24 horas), foi implantado um cateter na bexiga segundo a técnica modificada por Gellai e Valtin (1979) para realização do protocolo experimental, que consiste de uma pequena incisão longitudinal no abdômen, exposição da bexiga e implantação do cateter (PE240, 4 cm de comprimento), o qual é fixado às camadas musculares adjacentes sob a sutura da pele. A observação da passagem livre de urina através do cateter foi o método utilizado para verificar se o cateter estava corretamente posicionado.

O volume urinário (em  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  de rim) foi coletado por gravidade em amostras obtidas sempre em um período de 10 minutos. Sódio urinário (em  $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{g}$  de rim) foi quantificado em um fotômetro de chama "Instrumentation Laboratories", modelo 943.

### 3.5 Protocolo Experimental

Para realização do protocolo experimental, todos os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas onde receberam água, ração em pó e tiveram suas urinas coletadas diariamente. Após vinte e um dias de tratamento com aspirina, os ratos foram retirados das gaiolas metabólicas e submetidos à contagem do tempo de sangramento, teste que corresponde à duração de uma pequena hemorragia, quando uma incisão de dimensões pequenas é praticada na pele artificialmente e em seguida foram realizados os experimentos agudos. Os ratos sofreram os procedimentos cirúrgicos descritos acima para os registros hemodinâmicos basais de PAM, FC e coleta de urina.

Para os experimentos agudos, após a implantação dos cateteres na artéria e veia femorais e bexiga, os animais, já acordados, foram colocados em gaiolas de contenção que limitavam seus movimentos e permitiam registros hemodinâmicos e coleta de urina. Os animais foram submetidos à infusão contínua de solução salina isotônica (por meio de uma bomba de infusão Havard modelo 795) à velocidade de 55  $\mu\text{L}/\text{min}$ , por um período de estabilização de 2 horas. Seguindo-se às duas horas do período de estabilização, iniciava-se a coleta de duas amostras de urina para determinação do volume e concentração de sódio urinário por um período controle de 20 minutos. Esta fase controle teve sua respectiva amostra denominada Controle (C1 e C2), coletado pelo tempo de 10 minutos cada. A seguir a velocidade de infusão da bomba foi aumentada ao equivalente em volume a 5% do peso corporal do animal, por um período de 30 minutos e novas amostras de urina também com tempo de 10 minutos cada, foram colhidas. Tal fase foi denominada de expansão e suas respectivas amostras de Expansão 1 (E1), Expansão 2 (E2) e Expansão 3 (E3). Na próxima fase, retornou-se à velocidade de infusão inicial de salina isotônica (55  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), procedendo-se à coleta de mais cinco amostras de urina também com intervalo de 10 minutos cada. Tal fase foi denominada de Recuperação e suas respectivas amostras de Recuperação 1 (R1), Recuperação 2 (R2), Recuperação 3 (R3), Recuperação 4 (R4) e Recuperação 5 (R5). Registros contínuos de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram realizados durante todo o período experimental, armazenados em disco rígido do computador e analisados

posteriormente.

Terminada esta fase do protocolo experimental os animais foram sacrificados e ambos os rins foram removidos e pesados, por meio de uma balança analítica, para normalização do volume urinário e excreção de sódio em relação à massa renal. Também foi realizado a remoção do fígado, seccionado transversalmente em fragmentos com espessura de 2 a 3 mm e fixados em formol a 4% para posterior análise histológica.

### **3.6 Análise das Amostras**

**Fluxo Urinário (FU).** As amostras de urina foram coletadas a cada 10 minutos em tubos plásticos previamente pesados e o volume urinário foi determinado gravimetricamente. Os valores foram normalizados pelo peso renal (grama de peso renal). O volume urinário ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ ) = (volume urinário) / (tempo de coleta [10min] / (g).

**Excreção Urinária de Sódio (ExUNa).** A concentração de sódio das amostras de urina foram medidas utilizando-se de um fotômetro de chama (Micronal, modelo B 262, São Paulo, Brasil) e a excreção urinária de sódio calculada. A excreção de sódio ( $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ ) = (volume urinário) x (concentração urinária de sódio).

### **3.7 Preparação Histológica**

O fígado era retirado, pesado, seccionado em fatias de aproximadamente 5 mm e colocados em formalina a 4%. Os fragmentos foram incluídos em parafina, com utilização de aparelho automático de inclusão.



Os cortes de 6 micrômetros de espessura, obtidos micrótomo rotativo, foram corados pela Hematoxilina, Eosina e pelo Picrosirius para colágeno e montados em Bálsamo do Canadá.

### **3.8 Análise Estatística**

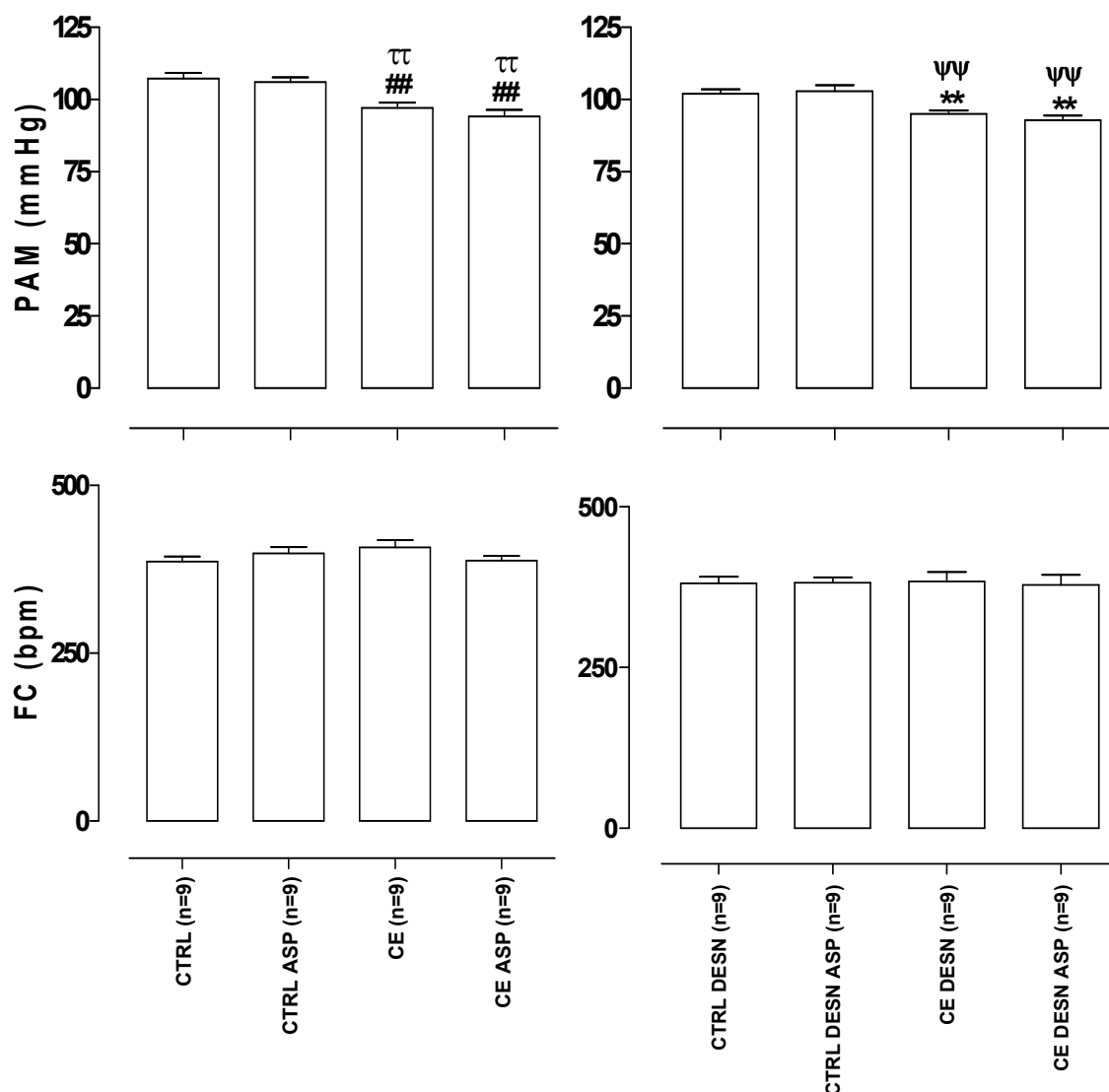
Os dados são apresentados com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados utilizando-se da análise de variância para medidas repetidas seguida do teste de Tukey para comparação entre médias. Os valores de  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$  foram considerados como significativos. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GB-STAT (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD, USA) 6.5 for Windows e para a plotagem dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism 2.0 (San Diego, CA, USA).

A mortalidade foi avaliada pelas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer, utilizando o programa SSPS para Windows (versão 9.0).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Pressão Arterial Média Basal e Frequência Cardíaca Basal

A figura 1 ilustra os valores basais de PAM e FC após 3 semanas de tratamento. Em relação aos valores basais de PAM observa-se diminuição da mesma nos animais com cirrose por meio da ligadura do ducto biliar que não receberam tratamento (CE) e dos que foram tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE ASP) quando comparados com os animais controle que não receberam tratamento (CTRL) e também quando comparados aos que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) (CE  $94 \pm 2$  mmHg; CE ASP  $94 \pm 2$  mmHg; CTRL  $107 \pm 2$  mmHg; CTRL ASP  $106 \pm 2$  mmHg;  $p < 0,01$ ). Para os animais submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnervação renal bilateral (CE DESN) e que foram tratados com aspirina (CE DESN ASP) também observa o mesmo comportamento na PAM quando os animais foram comparados com os do grupo controle e desnervados (CTRL DESN) e também quando foi feita a comparação com os do grupo controle e desnervados que receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN ASP) (CE DESN  $95 \pm 2$  mmHg CE DESN ASP  $93 \pm 2$  mmHg CTRL DESN  $102 \pm 2$  mmHg CTRL DESN ASP  $103 \pm 2$  mmHg;  $p < 0,01$ ). As diferenças nos valores basais de FC não foram significativas nos grupos estudados.



**Figura 1.** Valores basais de PAM e FC de ratos com cirrose experimental secundária à ligadura dos ductos biliares após 3 semanas de tratamento com aspirina (ASP) 1,2mg/Kg. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM dos animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP), não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos a ligadura do ducto biliar (CE), e tratados com aspirina (CE ASP), e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP). <sup>##</sup> p < 0,01 em relação aos ratos do grupo CTRL; <sup>^</sup> p < 0,01 em relação aos ratos do grupo CTRL ASP; <sup>\*</sup> p < 0,01 em relação aos ratos do grupo CTRL DESN; <sup>^^</sup> p < 0,01 em relação aos ratos do grupo CTRL DESN ASP.

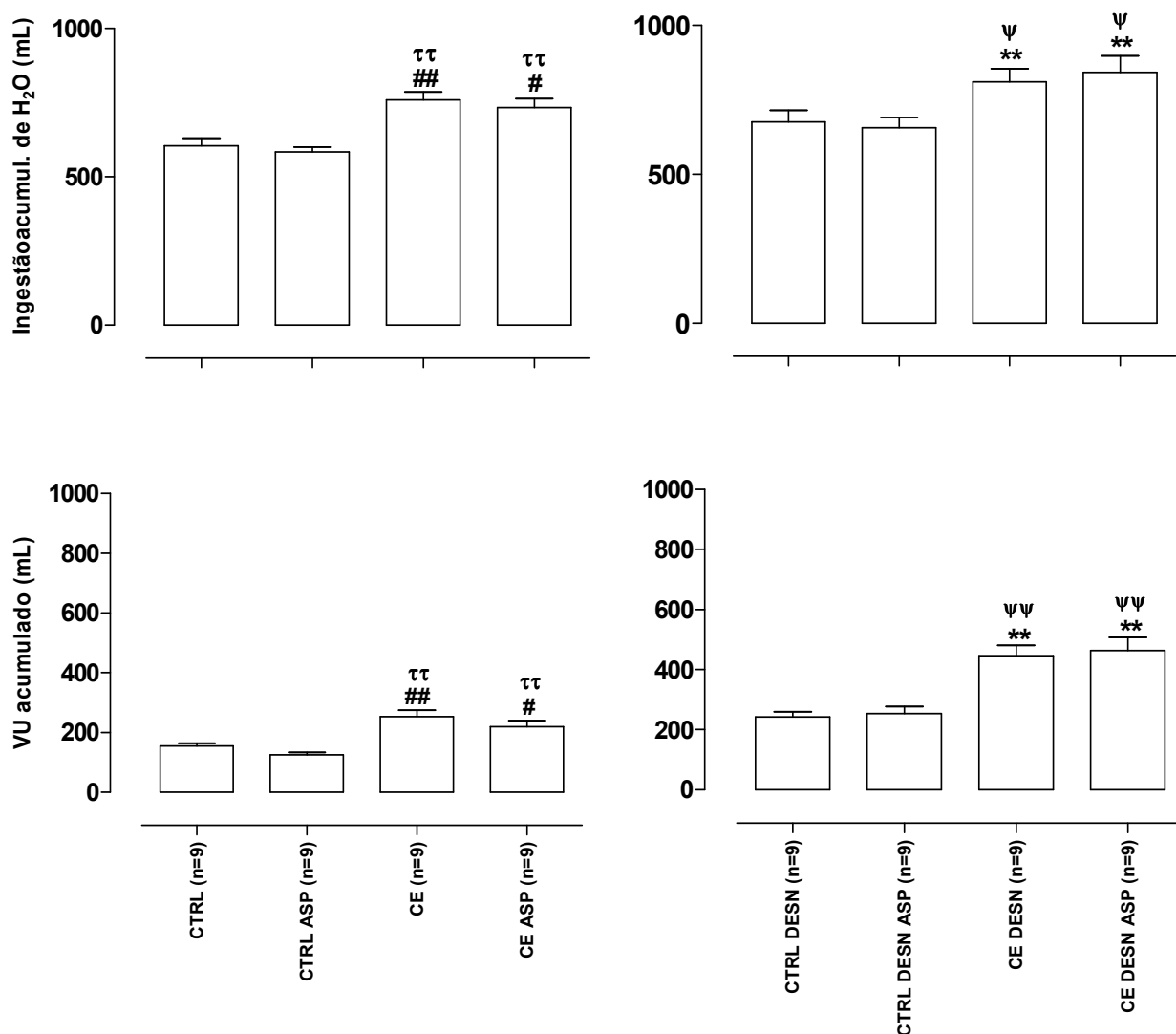
## 5.2 Ingestão de Água e Excreção Diária de Volume Urinário e Sódio

Na figura 2 estão mostrados os valores acumulados da ingestão de água e diurese por 3 semanas. A ingestão de água dos animais com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar que não receberam tratamento (CE) e dos que foram tratados com aspirina (CE ASP) encontra-se aumentada quando comparados com os animais controle que não receberam tratamento (CTRL) e ou que foram tratados com aspirina. (CTRL ASP) (CE  $760 \pm 26$  mL; CE ASP  $733 \pm 29$  mL; CTRL  $604 \pm 26$  mL; CTRL ASP  $585 \pm 16$  mL  $p < 0,01$ ). Para os animais com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar e desnervados (CE DESN) e para os que receberam tratamento com aspirina (CE DESN ASP), a ingestão de água também apresenta o mesmo comportamento quando os animais foram comparados com os do grupo controle e desnervados (CTRL DESN) e ou com os do grupo controle e desnervados que receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN ASP) (CE DESN  $811 \pm 44$  mL; CE DESN ASP  $842 \pm 56$  mL; CTRL DESN  $676 \pm 38$  mL; CTRL DESN ASP  $656 \pm 33$  mL  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). Já quando compara-se os grupos que foram submetidos à desnervação renal bilateral (CTRL DESN, CTRL DESN ASP, CE DESN, CE DESN ASP) com os seus respectivos controles (CTRL, CTRL ASP, CE, CE ASP), embora maior a ingestão de água, não houve diferença significativa entre os grupos

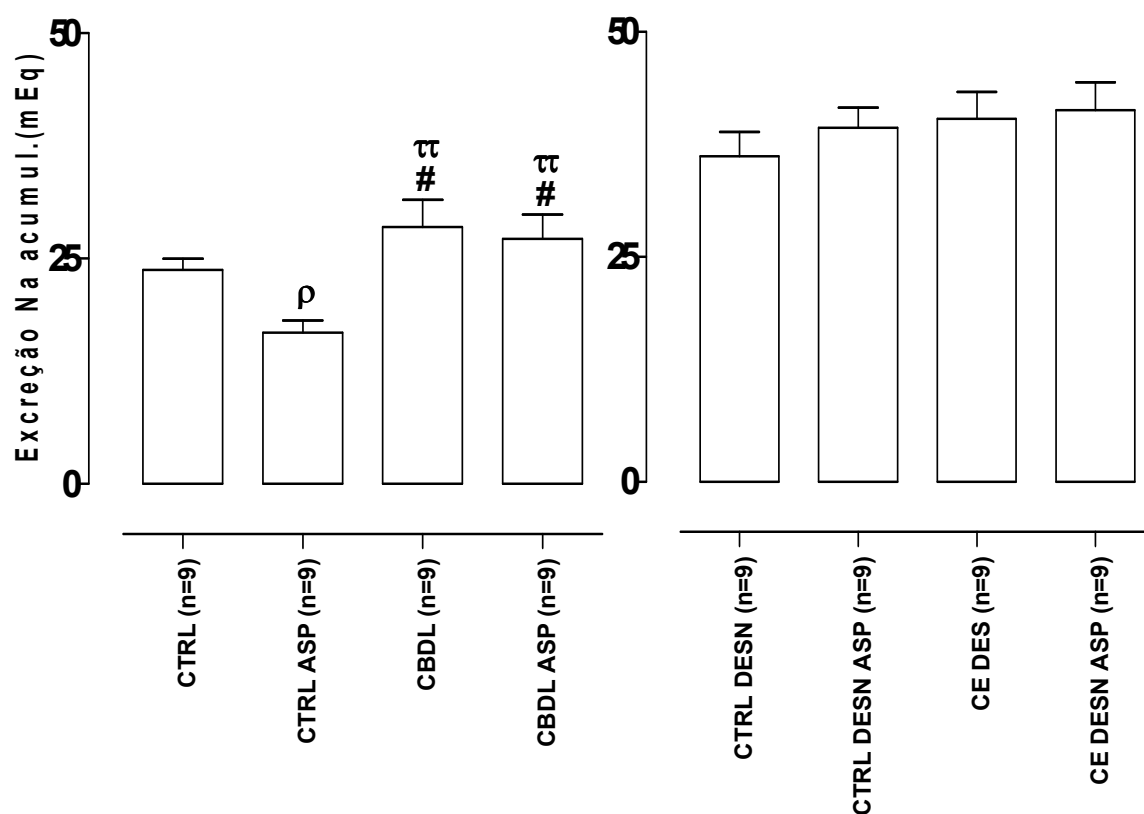
O volume de urina (VU) acumulado nos grupos com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar (CE) e que foram tratados com aspirina (CE ASP) foi maior quando comparados com os dois grupos controles, animais do grupo controle que não receberam tratamento (CTRL) e ou que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) (CE  $253 \pm 22$  mL; CE ASP  $220 \pm 21$  mL; CTRL  $154 \pm 10$  mL; CTRL ASP  $125 \pm 8$  mL  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado para a diurese nos animais que foram submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnervação (CE DESN) e para os que foram tratados com aspirina (CE DESN ASP) quando comparados com os animais dos grupos controles que não receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN) e ou que foram tratados (CTRL DESN ASP) (CE DESN  $446 \pm 34$  mL; CE DESN ASP  $463 \pm 45$  mL; CTRL DESN  $242 \pm 17$  mL; CTRL DESN

ASP  $253 \pm 23$  mL  $p < 0,01$ ). Quando se compara a influência da desnervação na diurese, os animais dos grupos controles que foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina (CTRL DESN ASP) apresentam diurese aumentada quando comparados com seus respectivos grupos controles que não foram desnervados (CTRL e CTRL ASP) ( $p < 0,01$ ). Também é observado que a diurese nos animais cirróticos e desnervados que receberam tratamento com aspirina ou não (CE DESN ASP e CE DESN) apresentam aumento significativo ( $p < 0,01$ ) quando comparados com os seus respectivos grupos de animais cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina (CE ASP e CE).

Os valores acumulados por 3 semanas da concentração de sódio na urina excretado diariamente são mostrados na figura 3. Os dados mostram que os animais do grupo controle que receberam tratamento com aspirina (CTRL ASP) excretam menor quantidade de sódio na urina quando comparados com os ratos do grupo controle que não receberam o tratamento (CTRL) ( $16 \pm 1,3$  vs  $23 \pm 1,2$  mEq  $p < 0,05$ ). Os animais com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar que não receberam tratamento (CE) e dos que foram tratados com aspirina (CE ASP) excretam uma maior quantidade de sódio na urina quando comparados com os animais controle que não receberam tratamento (CTRL) e também aos que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) (CE  $28 \pm 3,0$  mEq; CE ASP  $27 \pm 2,7$  mEq; CTRL  $23 \pm 1,2$  mEq; CTRL ASP  $16 \pm 1,2$  mEq  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). Nos grupos de animais controles e dos cirróticos submetidos à desnervação renal bilateral que foram tratados ou não com aspirina (CTRL DESN, CTRL DESN ASP, CE DESN, CE DESN ASP) os valores acumulados das diferenças da concentração de sódio na urina excretado diariamente não foram significativas nos grupos estudados. Já quando se compara esses mesmos grupos (CTRL DESN, CTRL DESN ASP, CE DESN, CE DESN ASP) com os seus respectivos grupos controles que não foram desnervados (CTRL, CTRL ASP, CE, CE ASP) a excreção de sódio na urina apresenta aumentada (CTRL DESN  $36 \pm 2,7$  mEq; CTRL DESN ASP  $\pm 39,38$  mEq; CE DESN  $40 \pm 3,0$  mEq; CE DESN ASP  $\pm 41 \pm 3,0$  mEq; CTRL  $23 \pm 1,2$  mEq; CTRL ASP  $16 \pm 1,3$  mEq; CE  $28 \pm 3,0$  mEq; CE ASP  $27 \pm 2,7$  mEq  $p < 0,01$ ).



**Figura 2.** Valores acumulados da ingestão de água e diurese de ratos com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar por 3 semanas de tratamento com aspirina (ASP) 1,2mg/Kg. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM dos animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP), não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos a ligadura do ducto biliar (CE), e tratados com aspirina (CE ASP), e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP). <sup>##</sup>  $p < 0,01$  e <sup>#</sup>  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL; <sup>ττ</sup>  $p < 0,01$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP; <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN; <sup>ψψ</sup>  $p < 0,01$  e <sup>ψ</sup>  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN ASP.

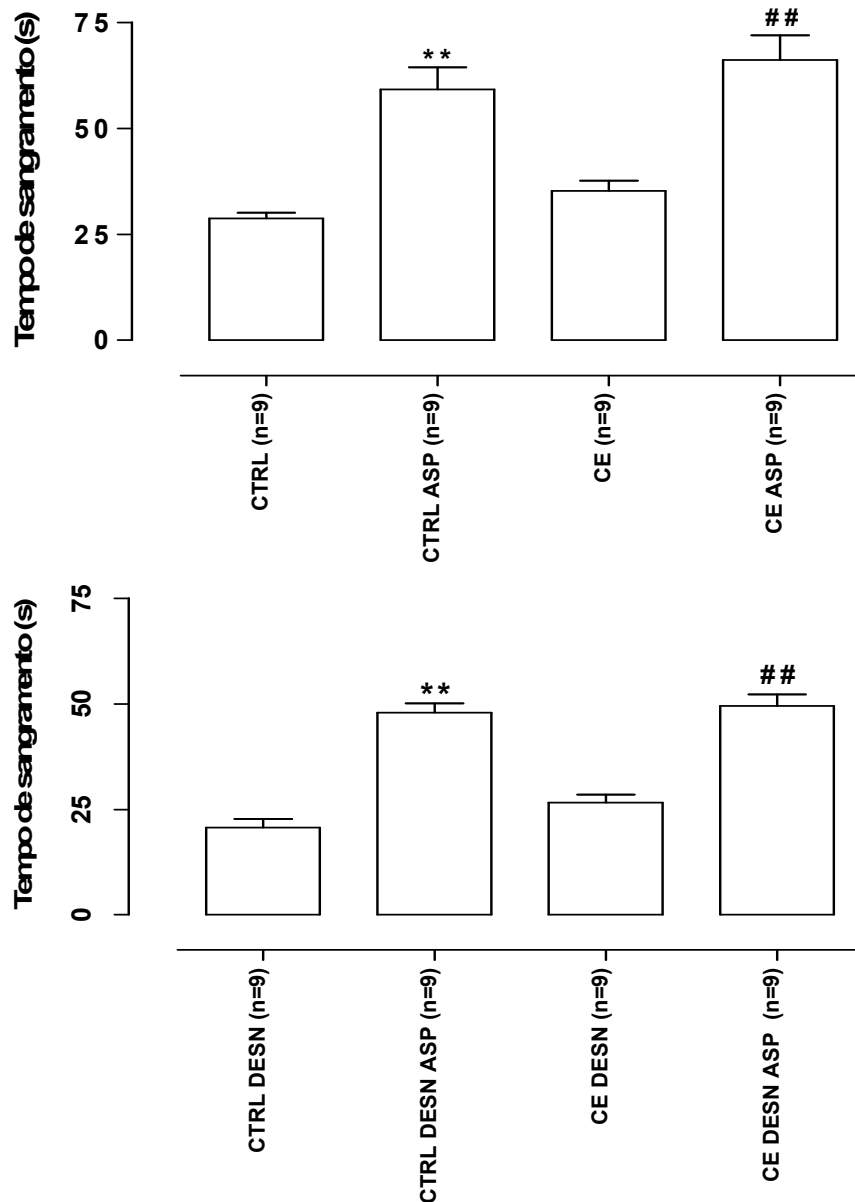


**Figura 3.** Valores da concentração de sódio na urina coletados diariamente de ratos com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar por 3 semanas de tratamento com aspirina (ASP) 1,2mg/Kg. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM dos animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP), não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos a ligadura do ducto biliar (CE), e tratados com aspirina (CE ASP), e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP).  $^{\tau}$   $p < 0,01$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP;  $^{\#}$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL e CTRL ASP;  $^p$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL.

### 5.3 Tempo de Sangramento

A figura 4 mostram os valores do tempo de sangramento com intuito de se verificar a eficácia do tratamento com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) por 3 semanas de tratamento. O tempo de sangramento dos animais dos grupos controle que receberam intervenção (tratamento com aspirina e ou desnervação e tratamento com aspirina) (CTRL ASP e CTRL DESN ASP) foi maior quando comparados com os seus respectivos grupos controles que não receberam tratamento (CTRL) e foram desnervados (CTRL DESN) (CTRL ASP  $59 \pm 5,2$  s; CTRL DESN ASP  $49 \pm 2,2$  s; CTRL  $29 \pm 1,3$  s; CTRL DESN  $21 \pm 2,0$  s  $p < 0,01$ ). Os animais com cirrose experimental secundária à ligadura do ducto biliar que receberam tratamento com aspirina (CE ASP) e ou desnervação e tratamento (CE DESN ASP) também apresentam o mesmo comportamento no tempo de sangramento quando comparados com os seus respectivos animais dos grupos cirróticos que não receberam tratamento com aspirina (CE) e que foram desnervados (CE DESN) (CE ASP  $66 \pm 5,8$  s; CE DESN ASP  $50 \pm 2,7$  s; CE  $35 \pm 2,4$  s; CE DESN  $27 \pm 2,0$  s  $p < 0,05$ ).





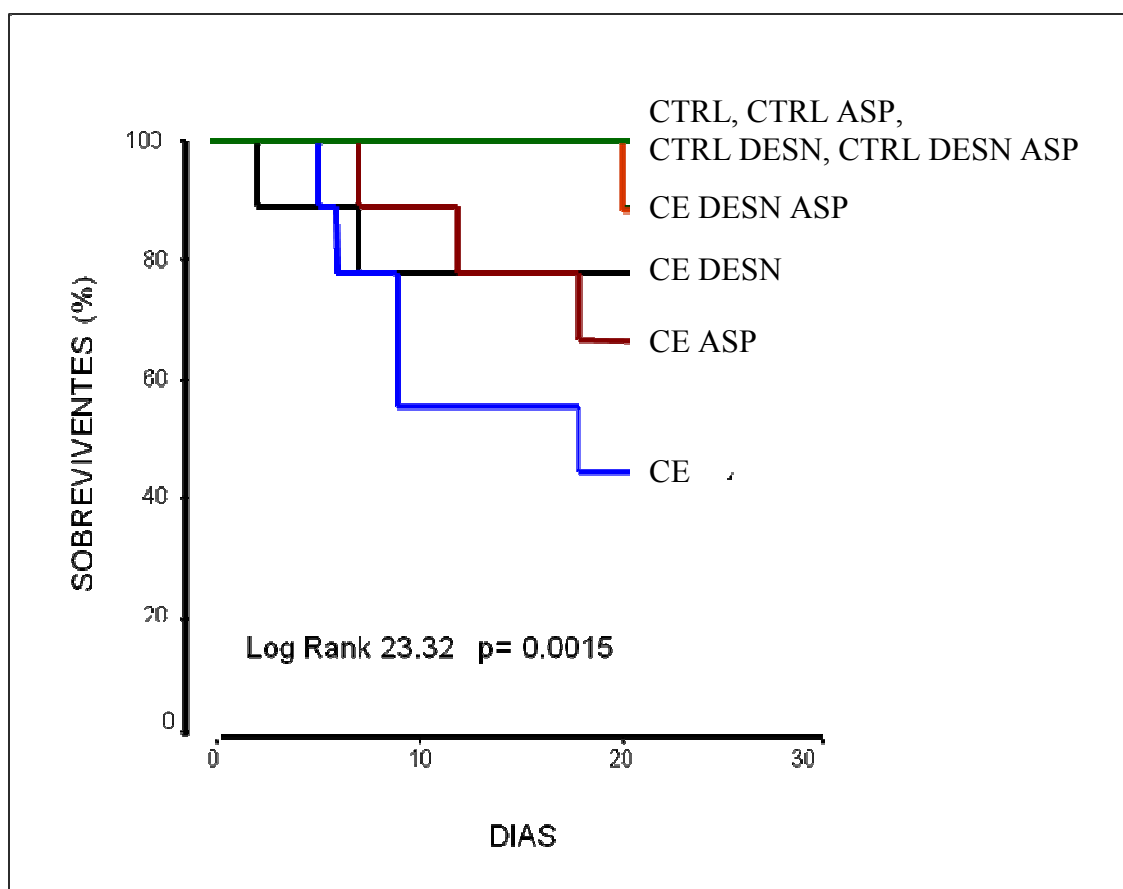
**Figura 4.** Valores do tempo de sangramento (s) após tratamento com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) por 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM dos animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP), não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar (CE), e tratados com aspirina (CE ASP), e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP). \*\* $p < 0,01$  em relação aos ratos do grupo CTRL e CTRL DESN; ##  $p < 0,01$  em relação aos ratos do grupo CE e CE DESN.

#### **5.4 Peso Corporal, Fígado e Rins**

Na tabela 1 estão mostrados os valores basais do peso corporal, fígado e rins, além dos pesos relativos destes órgãos após 21 dias dos animais terem sido submetidos à ligadura do ducto biliar e recebido ou não tratamento com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP). Como pode observar nos animais dos grupos cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina (CE e CE ASP) e que foram desnervados tratados ou não com aspirina (CE DESN e CE DESN ASP), houve aumento significativo ( $p < 0,01$ ) no peso do fígado quando comparados aos seus respectivos ratos controle (CTRL; CTRL ASP; CTRL DESN; CTRL DESN ASP). Em relação aos rins, muito embora os animais dos grupos que foram submetidos à ligadura do ducto biliar, a desnervação ou não e que receberam ou não tratamento com aspirina (CE, CE ASP, CE DESN, CE DESN ASP) tenham apresentados a redução significativa do peso dos rins, quando analisado em relação ao peso corporal esta redução não se apresentou significativa. Tal fato provavelmente se explica pelo fato do peso corporal desses animais não terem apresentado o mesmo ganho de peso do observado nos seus respectivos animais controle, muito embora a presença de ascite tenha sido visivelmente constatada naqueles animais.

## 5.5 Sobrevivência dos Animais

Na figura 5 estão as curvas de sobrevivência de ratos controle (falsos operados) e os submetidos à ligadura do ducto biliar, desnervados ou após 3 semanas de tratamento com aspirina (ASP). A taxa de mortalidade dos animais submetidos à ligadura do ducto biliar que não recebeu tratamento (CE) foi significativamente maior quando comparados com os dois grupos controles, que não receberam tratamento (CTRL) e ou que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) ( $p=0,0154$ ). A mortalidade no grupo CE ASP foi maior quando comparada aos grupos controle, mas a diferença não foi significativa (0,0652). De modo semelhante à taxa de mortalidade nos grupos CE DESN ou CE DESN ASP comparada com a dos respectivos controles (CTRL DESN e CTRL DESN ASP) embora menor, também não mostrou diferença significativa (respectivamente,  $p=0,1451$  e  $p=0,3173$ ). Quando se compara a mortalidade nos grupos cirróticos que receberam intervenção (tratados com aspirina ou desnervados ou desnervados e tratados com aspirina) com o grupo cirrótico (CE) que não recebeu nenhum tratamento a diferença só é significativa para o grupo que sofreu desnervação e foi tratado com aspirina (CE DESN ASP) ( $p=0,0354$ ). Para os grupos tratados apenas com aspirina ou com a desnervação as diferenças não foram significativas. A proteção do efeito da desnervação associada à aspirina torna-se mais evidente quando se observa na figura 5, que a mortalidade neste grupo ocorreu mais tardiamente do que no grupo CBDL sem tratamento.



**Figura 5.** Curva de sobrevivência de ratos submetidos à ligadura do ducto biliar e mantidos sem tratamento (CE), ou tratados com aspirina (CE ASP) ou desnervados (CE DESN) ou desnervados e tratados com aspirina (CE DESN ASP) e de animais falsos-operados que não receberam nenhum tratamento (CTRL) ou tratados com aspirina (CTRL ASP) ou que foram desnervados e não tratados com aspirina (CTRL DESN) ou desnervados e tratados com aspirina (CTRL DESN ASP). O tratamento com aspirina foi feito durante 3 semanas na dose de 1,2 mg/Kg. A desnervação foi realizada cinco dias antes da ligadura do ducto biliar. N=9 animais por grupo.

Teste de significância da mortalidade entre os grupos (Teste de Log Rank): CE x CTRL:  $p=0,0154$ ; CE ASP x CTRL ASP:  $p=0,0652$ ; CE DESN x CTRL DESN:  $p=0,1451$ ; CE DESN ASP x CTRL DESN ASP:  $p=0,3173$ ; CE x CE ASP:  $p=0,2942$ ; CE x CE DESN:  $p=0,2238$ ; CE x CE DESN ASP:  $p=0,0354$ .

## 5.6 Respostas Cardiovasculares e Renais à Sobrecarga de Volume

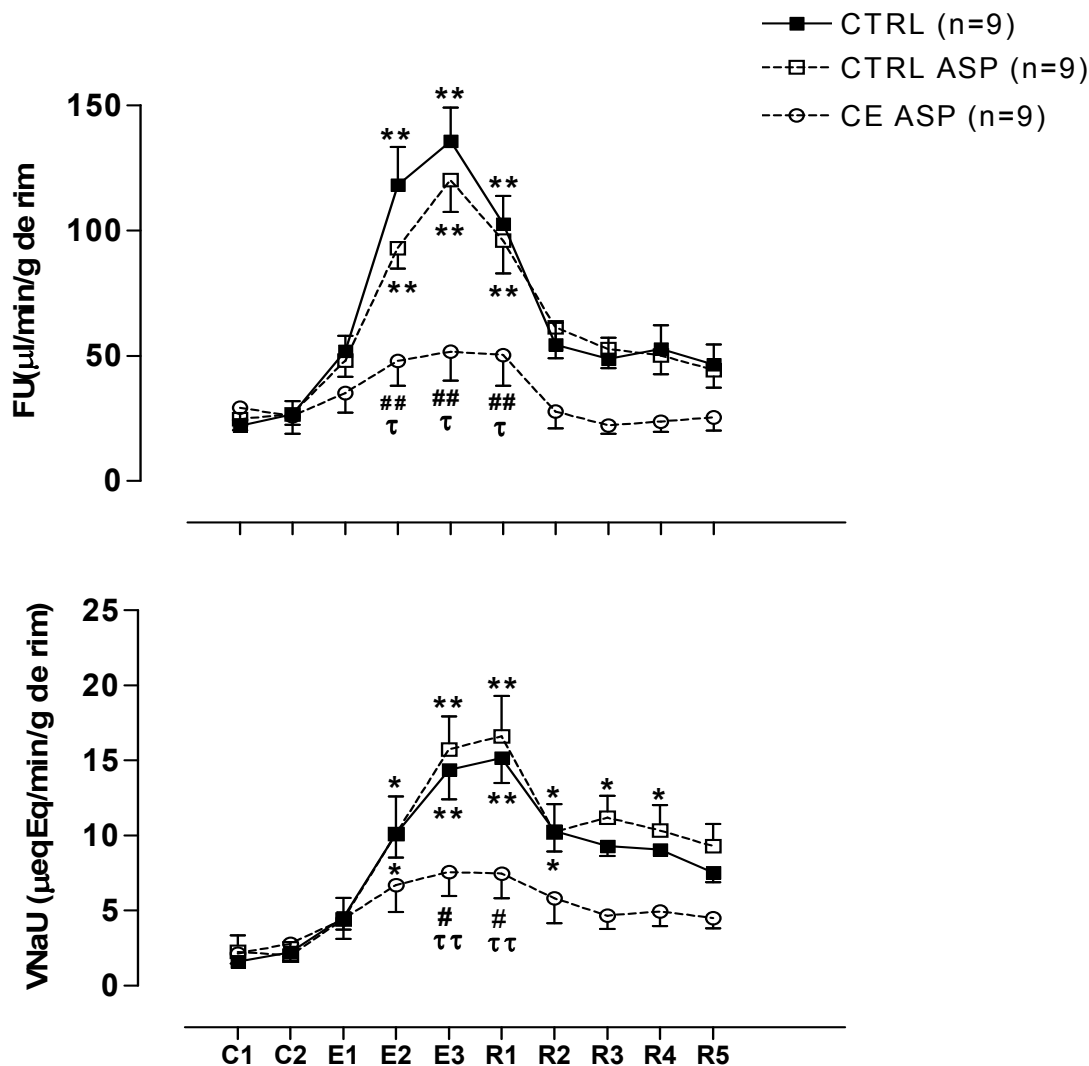
As figuras 6 e 7 ilustram as respostas diurética e natriurética à infusão de solução salina isotônica em ratos dos grupos controle, que não receberam tratamento com aspirina (CTRL) e que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) e ratos dos grupos submetidos à ligadura do ducto biliar, que não receberam tratamento com aspirina (CE) e que foram tratados com aspirina 1,2mg/Kg (ASP) (CE ASP) por 3 semanas. Nos grupos de ratos controle, que receberam ou não tratamento com aspirina (CTRL e CTRL ASP) e os grupos de ratos submetidos à ligadura do ducto biliar que receberam ou não tratamento (CE e CE ASP), os valores de fluxo urinário (FU) e excreção de sódio (ExNa) na fase controle (C1, C2) são similares nos quatro grupos (tabela 2). A expansão hidrossalina (E1, E2, E3) promoveu aumento progressivo ( $p < 0,01$ ) de tais parâmetros nos grupos controle que receberam ou não tratamento com aspirina (CTRL e CTRL ASP), entretanto, não houve diferenças significativas para esses parâmetros entre os grupos (Tabela 2). Nos grupos de ratos que foram submetidos à ligadura do ducto biliar, que não receberam tratamento com aspirina (CE) e que foram tratados com aspirina (CE ASP), durante a fase de expansão volêmica, as respostas diurética e natriurética nesses grupos foram menores quando comparadas com as dos grupos controle que não receberam tratamento (CTRL) e também quando foi feita a comparação com os ratos do grupo que receberam tratamento com aspirina (CTRL ASP) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) porém, não houve diferenças significativas para esses parâmetros entre os grupos cirróticos (Tabela 2). Durante a fase de recuperação (R1, R2, R3, R4, R5) nos grupos de ratos controle, que não receberam tratamento (CTRL) e que foram tratados com aspirina (CTRL ASP) não houve diferenças significativa na diurese e natriurese entre os grupos, havendo redução progressiva ( $p < 0,01$ ) das mesmas, com tendências para retorno aos valores basais (fase controle) (tabela 2). Nos grupos de ratos submetidos à ligadura do ducto biliar, que não receberam tratamento com aspirina (CE) e que receberam tratamento com aspirina (CE ASP), apenas na fase R1, houve diminuição da diurese e natriurese, quando foram comparados aos grupos controle que recebeu ou não tratamento com aspirina ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), nas demais fases não houve diferença significativa (Tabela 2). Durante a fase de recuperação (R1, R2, R3, R4,

R5) não houve diferença significativa da diurese e natriurese entre os animais dos grupos cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina.

A figura 8 mostra as respostas diuréticas e natriuréticas à infusão de solução salina isotônica em ratos dos grupos controle e desnervados, que não receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN) e que foram tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (CTRL DESN ASP) por 3 semanas. A figura 9 também mostra essas respostas nos mesmos parâmetros estudados, porém para os ratos do grupo controle e desnervado que receberam tratamento com aspirina e para os ratos submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnervação renal bilateral, que não receberam tratamento com aspirina (CE DESN) e que foram tratados com aspirina (CE DESN ASP) durante 3 semanas. Nas figuras 8 e 9, após o período de estabilização de duas horas, observa-se que os valores de fluxo urinário e excreção de sódio na fase controle (C1,C2) nos ratos controle e desnervados que recebeu ou não tratamento com aspirina (CTRL DESN e CTRL DESN ASP) são similares aos grupos de ratos submetidos a ligadura do ducto biliar e a desnervação que receberam ou não tratamento com aspirina (CE DESN e CE DESN ASP) (tabela 3). A figura 8 mostra que a expansão hidrossalina (E1,E2,E3) promoveu aumento progressivo ( $p<0,01$ ) de tais parâmetros principalmente em ratos do grupo controle e desnervados que receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN ASP) e que houve aumento significativo ( $p<0,01$  e  $p<0,05$ ) para esses parâmetros, nas fases de expansão E2 e E3, quando comparado com o grupo de ratos controle e desnervados que não receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN) (Tabela 3). Durante a fase de recuperação (R1, R2, R3, R4, R5) também houve aumento, porém só da natriurese nas fases R1 e R2 ( $p<0,01$  e  $p<0,05$ ), nas demais fases não houve diferenças significativas na diurese e natriurese entre os grupos havendo redução progressiva ( $p<0,05$ ) das mesmas, com tendência para retorno aos valores basais (fase controle) (Tabela 3). A figura 9 mostra que a expansão hidrossalina (E1, E2, E3) nos grupos de ratos cirróticos e desnervados que receberam ou não tratamento com aspirina (CE DESN e CE DESN ASP), não promoveu aumento progressivo da diurese e natriurese entre os grupos, porém houve nas fases E2 e E3 menores valores de fluxo urinário e excreção de sódio desses animais quando comparados ao grupo de ratos controle e desnervados que receberam tratamento ( $p<0,01$  e  $p<0,05$ ) (Tabela 3). Durante a fase de recuperação (R1, R2, R3, R4, R5) houve o mesmo

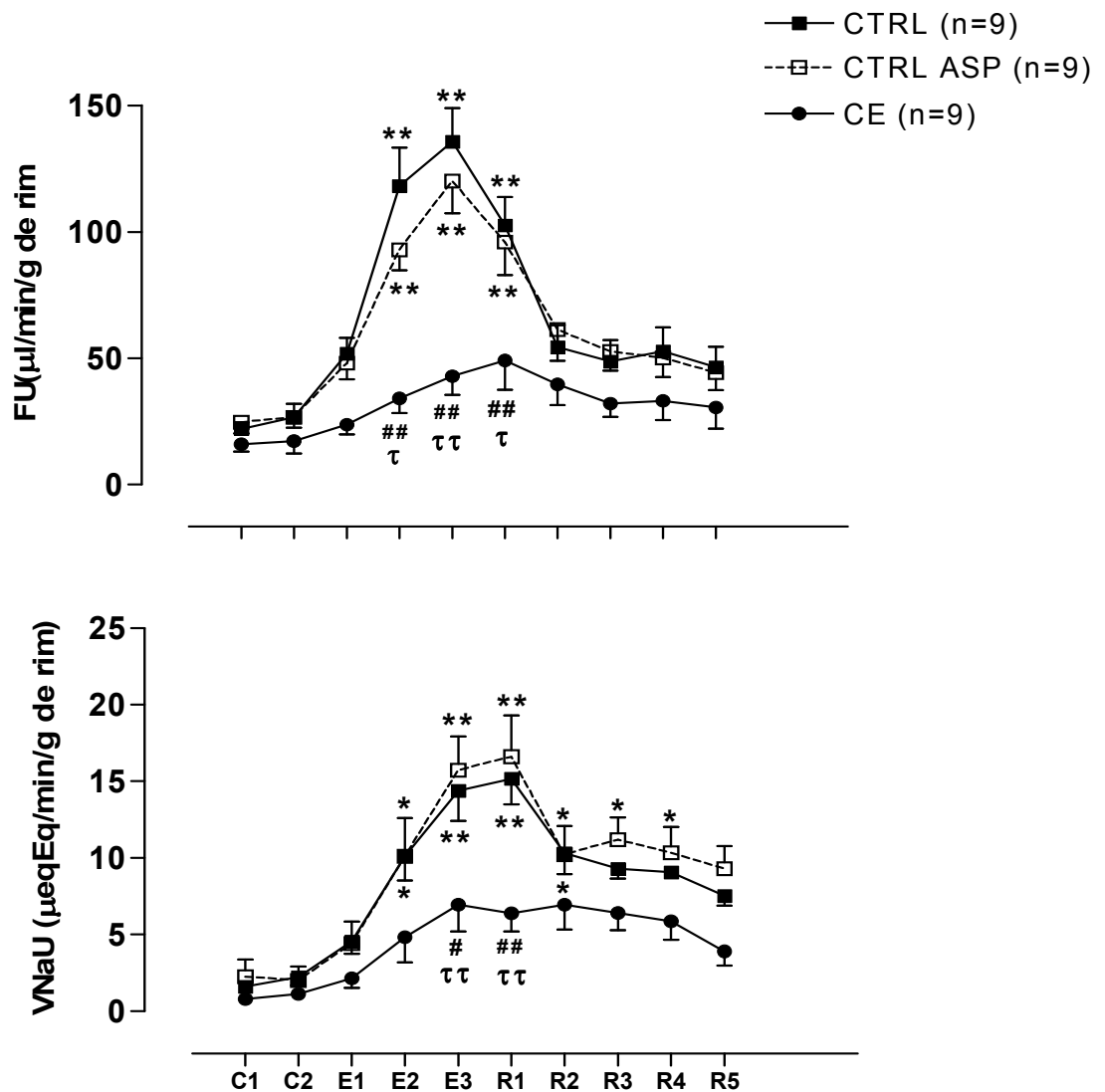
comportamento na diurese e natriurese, porém apenas nas fases R1 e R2, nas demais fases, embora menor, não mostrou diferenças significativa das mesmas com tendências para retorno aos valores basais (fase controle). Para avaliar a participação da atividade simpática renal na diurese e natriurese, na cirrose experimental, foram realizadas as comparações entre os grupos de ratos controle e desnervados que receberam ou não tratamento com aspirina (CTRL DESN e CTRL DESN ASP) com os seus respectivos grupos de ratos controle que receberam ou não tratamento com aspirina (CTRL e CTRL ASP), também foram realizadas as comparações para os mesmos parâmetros nos grupos de ratos submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnevação que receberam ou não tratamento com aspirina (CE DESN e CE DESN ASP) com seus respectivos grupos de ratos cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina (CE e CE ASP). Houve menor respostas diuréticas e natriuréticas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) apenas na fase final de expansão volêmica (E3) e na fase inicial de recuperação (R1) no grupo de ratos controle e desnervados quando comparado ao grupo de ratos controle (CTRL), as outras comparações com os seus respectivos grupos controles não apresentaram diferenças significativas.

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos dos grupos estudados, a PAM mostrou-se significativamente menor ( $p < 0,05$ ) nas diferentes fases estudadas (Tabela 2 e figura 10) nos grupos de ratos cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina (CE e CE ASP) quando comparados com os dois grupos controles, animais do grupo controle que não receberam tratamento (CTRL) e ou que foram tratados com aspirina (CTRL ASP), porém na FC não observa diferenças significativas. Observa-se também o mesmo comportamento na PAM ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) nos grupos de animais cirróticos e desnervados, que receberam ou não tratamento com aspirina (CE DESN e CE DESN ASP) quando comparados com os do grupo controle e desnervados (CTRL DESN) e ou com os do grupo controle e desnervados que receberam tratamento com aspirina (CTRL DESN ASP) (Tabela 3 e figura 11). Já a FC, nas diferentes fases nos grupos estudados não houve diferença significativa.

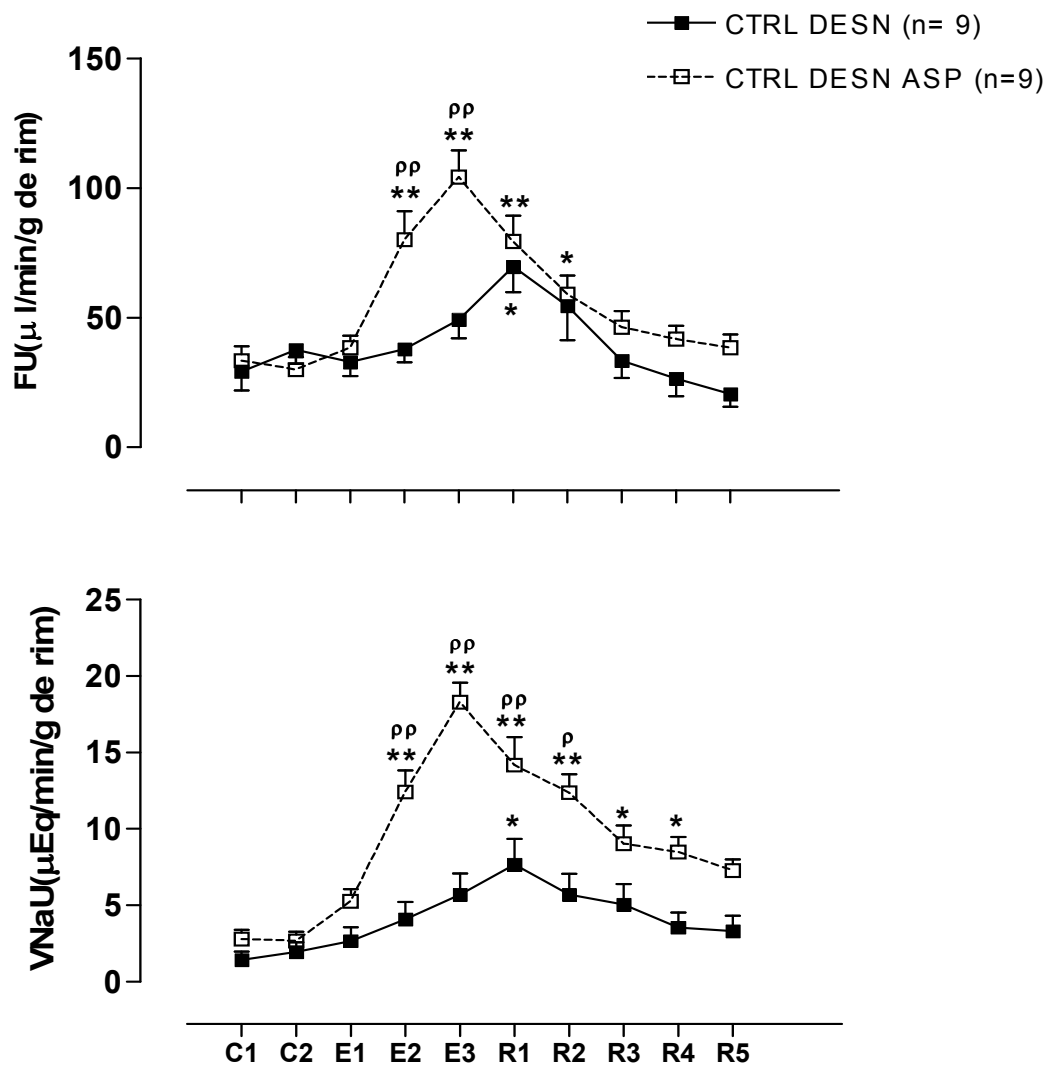


**Figura 6.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônica no volume equivalente a 5 % do peso corporal) em animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina (CTRL ASP) e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE ASP) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu$ l/min. \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação à fase controle; ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL; ττ  $p < 0,01$  e τ  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP

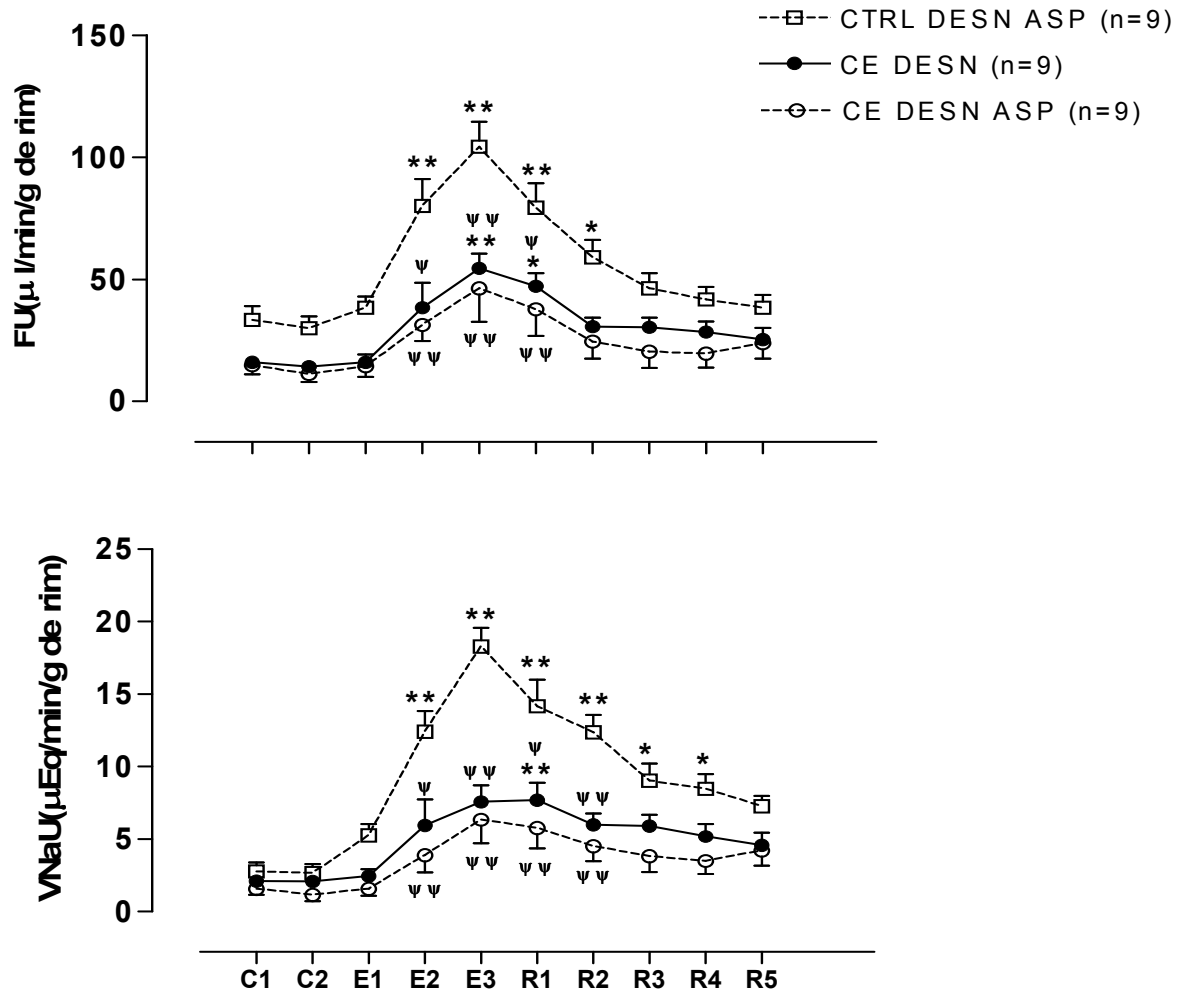




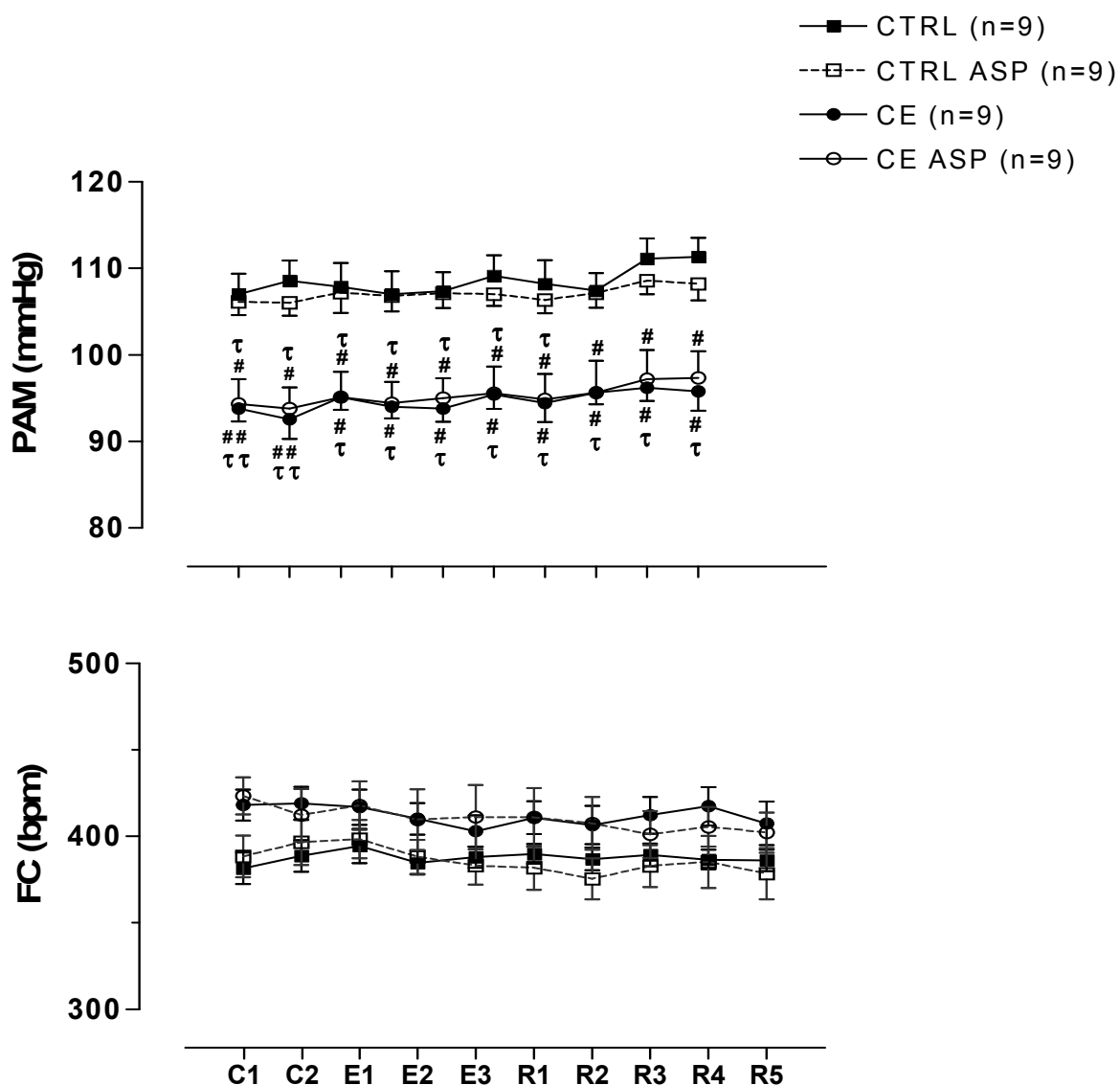
**Figura 7.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônica no volume equivalente a 5 % do peso corporal) em animais controle: não receberam tratamento (CTRL), tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CTRL ASP) e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar (CE) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu$ l/min. \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação à fase controle; ##  $p < 0,01$  #  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL;  $\tau\tau$   $p < 0,01$  e  $\tau$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP.



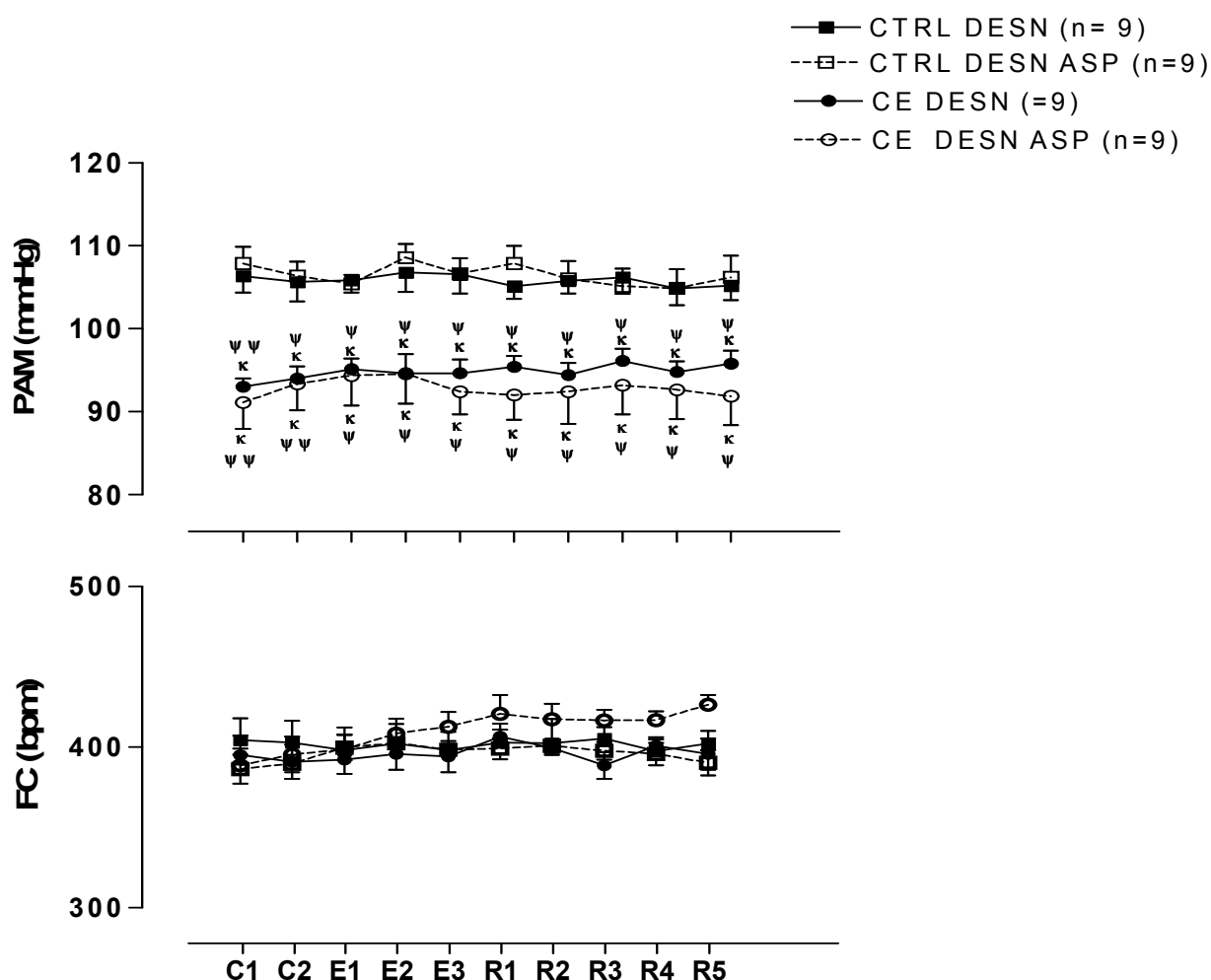
**Figura 8.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônica no volume equivalente a 5 % do peso corporal) em animais controle: não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) e desnervados (CTRL DESN ASP) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu\text{l/min}$ . \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação à fase controle; <sup>pp</sup>  $p < 0,01$  e <sup>p</sup>  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN.



**Figura 9.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônica no volume equivalente a 5 % do peso corporal) em animais controle: tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP) e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE DESN ASP) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu\text{l}/\text{min}$ . \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  em relação à fase controle;  $\Psi\Psi$   $p < 0,01$   $\Psi$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN ASP.



**Figura 10.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônica no volume equivalente a 5 % do peso corporal) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais do grupo controle: não receberam tratamento (CTRL) e tratados com aspirina (CTRL ASP) e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar (CE) e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP (CE ASP) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu$ l/min. ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL e  $\tau\tau$   $p < 0,01$  e  $\tau$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP.



**Figura 11.** Efeito da expansão de volume (infusão de salina isotônico no volume equivalente a 5 % do peso corporal) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais do grupo controle: não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos a ligadura do ducto biliar e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE DESN ASP) durante 3 semanas. Os valores representam as médias  $\pm$  EPM, ilustrando o fluxo urinário (FU) e a excreção de sódio (ExNa) corrigidos por grama de rim nas fases controle (C1, C2), expansão (E1, E2, E3) e recuperação (R1, R2, R3, R4, R5). Nas fases controle e recuperação, os animais receberam infusão contínua de salina isotônica ao fluxo de 55  $\mu$ l/min.  $^{\kappa}$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN;  $^{\Psi\Psi}$   $p < 0,01$  e  $^{\Psi}$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL DESN ASP.

**Tabela 2.** Valores de fluxo urinário (FU), excreção de sódio (EXNa), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais do grupo controle: não receberam tratamento (CTRL) e tratados com aspirina (CTRL ASP) e dos animais experimentais: submetidos à ligadura do ducto biliar (CE) e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE ASP) durante 3 semanas, obtidos na fase controle (C2), expansão (E3) e recuperação (R3).

	CTRL (n=9)			CTRL ASP (n=9)		
	C2	E3	R3	C2	E3	R3
FU ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ )	26,6 $\pm$ 2,5	135,6 $\pm$ 13,4**	54,3 $\pm$ 8,8	26,5 $\pm$ 4,0	120 $\pm$ 12,8**	58,3 $\pm$ 12,4
ExNa ( $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{g}$ )	2,2 $\pm$ 0,6	14,4 $\pm$ 1,9**	10,3 $\pm$ 1,4	2,0 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 2,2**	10,2 $\pm$ 1,8*
PAM (mmHg)	108 $\pm$ 2,3	107 $\pm$ 2,3	107 $\pm$ 2,0	106 $\pm$ 1,4	107 $\pm$ 1,6	107 $\pm$ 1,6
FC (bpm)	388 $\pm$ 9,1	388 $\pm$ 6,0	389 $\pm$ 6,5	396 $\pm$ 14	383 $\pm$ 11	383 $\pm$ 12

	CE (n=9)			CE ASP (n=9)		
	C2	E3	R3	C2	E3	R3
FU ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ )	21,2 $\pm$ 4,9	42,8 $\pm$ 17,2 <sup>##<math>\tau\tau</math></sup>	39,6 $\pm$ 8,1	25,7 $\pm$ 6,9	51,5 $\pm$ 16,5 <sup>##<math>\tau</math></sup>	31,65 $\pm$ 7,5
ExNa ( $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{g}$ )	1,6 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 1,7 <sup>#<math>\tau\tau</math></sup>	6,9 $\pm$ 1,6	2,6 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 1,5 <sup>#<math>\tau</math></sup>	5,83 $\pm$ 1,6
PAM (mmHg)	93 $\pm$ 2,2 <sup>##<math>\tau\tau</math></sup>	94 $\pm$ 1,5 <sup>#<math>\tau</math></sup>	96 $\pm$ 1,4 <sup>#<math>\tau</math></sup>	94 $\pm$ 2,5 <sup>#<math>\tau</math></sup>	95 $\pm$ 2,3 <sup>#<math>\tau</math></sup>	96 $\pm$ 3,6 <sup>#</sup>
FC (bpm)	400 $\pm$ 9	403 $\pm$ 9,0	406 $\pm$ 12	412 $\pm$ 15,3	411 $\pm$ 18,6	407 $\pm$ 15,3

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  em relação à fase controle; #  $p < 0,01$  e ##  $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL e  $\tau\tau$   $p < 0,01$  e  $\tau$   $p < 0,05$  em relação aos ratos do grupo CTRL ASP.

**Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU), excreção de sódio (EXNa), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais dos grupos controle: não receberam tratamento e foram desnervados (CTRL DESN) e tratados com aspirina e desnervados (CTRL DESN ASP); e dos animais experimentais: submetidos a ligadura do ducto biliar e desnervados (CE DESN), e desnervados e tratados com aspirina 1,2 mg/Kg (ASP) (CE DESN ASP), obtidos na fase controle (C2), expansão (E3) e recuperação (R3).

	CTRL DESN (n=9)			CTRL DESN ASP (n=9)		
	C2	E3	R3	C2	E3	R3
FU ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ )	35,6 $\pm$ 5,5	49,3 $\pm$ 7,3	33,4 $\pm$ 6,6	29,5 $\pm$ 4,8	104,2 $\pm$ 10,3 <sup>**pp</sup>	46,3 $\pm$ 6,3
ExNa ( $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{g}$ )	1,9 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 0,6	18,3 $\pm$ 1,3 <sup>**pp</sup>	9,0 $\pm$ 1,2*
PAM (mmHg)	105 $\pm$ 2,4	106 $\pm$ 2,3	106 $\pm$ 2,0	106 $\pm$ 1,8	107 $\pm$ 1,8	105 $\pm$ 2,2
FC (bpm)	403 $\pm$ 14	398 $\pm$ 12	405 $\pm$ 7	390 $\pm$ 5,4	398 $\pm$ 3,8	397 $\pm$ 5,6

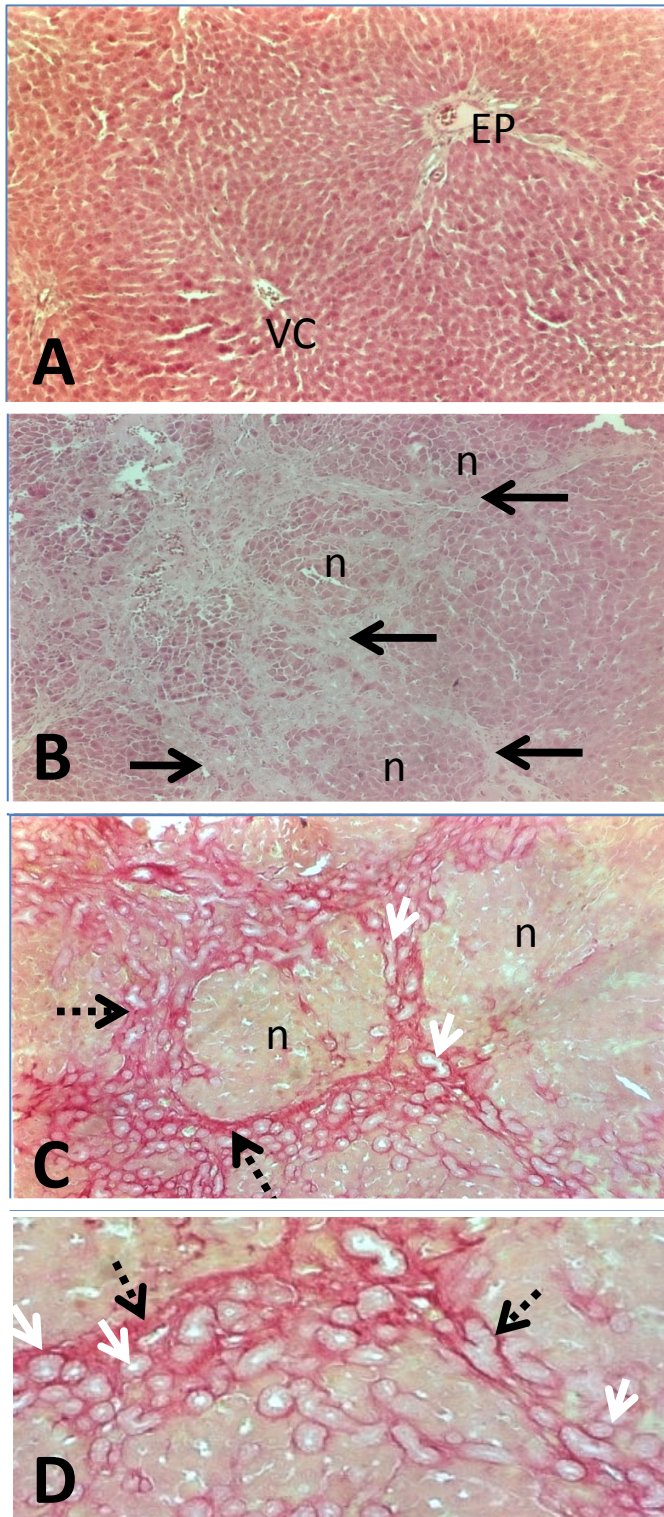
	CE DESN (n=9)			CE DESN ASP (n=9)		
	C2	E3	R3	C2	E3	R3
FU ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ )	14,2 $\pm$ 2,1	54,5 $\pm$ 6,1 <sup>**<math>\Psi\Psi</math></sup>	30,4 $\pm$ 3,9	11,2 $\pm$ 3,1	46,4 $\pm$ 13,9 <sup><math>\Psi\Psi</math></sup>	20,4 $\pm$ 6,7
ExNa ( $\mu\text{eq}/\text{min}/\text{g}$ )	2,1 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 1,2 <sup><math>\Psi\Psi</math></sup>	5,9 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 0,5	6,4 $\pm$ 1,6 <sup><math>\Psi\Psi</math></sup>	3,8 $\pm$ 1,1
PAM (mmHg)	94 $\pm$ 1,4 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>	95 $\pm$ 2,2 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>	96 $\pm$ 1,5 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>	93 $\pm$ 3,1 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>	92 $\pm$ 2,7 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>	92 $\pm$ 3,5 <sup><math>\kappa\Psi</math></sup>
FC (bpm)	390 $\pm$ 11	394 $\pm$ 9,7	388 $\pm$ 8,4	395 $\pm$ 11	412 $\pm$ 9,2	416 $\pm$ 6,8

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\* p<0,01 em relação à fase controle; <sup>pp</sup> p<0,01 em relação aos ratos do grupo CTRL DESN;  <sup>$\kappa$</sup> p< 0,05 em relação aos ratos do grupo CTRL DESN;  <sup>$\Psi\Psi$</sup>  p<0,01 e  <sup>$\Psi$</sup>  0,05 em relação aos ratos do grupo controle CTRL ASP.

## 5.7 Histologia Hepática

A figura 12 mostra a análise histológica dos cortes dos fígados dos grupos de ratos falso-operados e dos grupos e ratos com cirrose secundária a ligadura do ductos biliares. Os animais falso-operados apresentavam fígado com estrutura histológica normal. Todos os animais que sofreram ligadura do ducto biliar, desnervados ou não ou tratados ou não com aspirina apresentavam um quadro microscópico semelhante. Chamava a atenção uma intensa proliferação de ductos biliares que a partir dos espaços porta invadiam o lóbulo, isolando grupos de hepatócitos, que eram perfeitamente delimitados pelo conjuntivo que acompanhava a proliferação ductal. Com frequência observou-se ductos biliares proliferados entre os cordões de hepatócitos, desorganizando a arquitetura lobular. Os ductos proliferados geralmente tinham luz muito pequena ou virtual e não continham bile. Raríssimos focos de necrose de hepatócitos e raras áreas de exsudação leucocitária. Apoptose de hepatócitos isolados e figuras de mitose eram às vezes observadas.





**Figura 12.** A-Aspecto histológico do fígado de um animal falso operado. Observar a arquitetura normal. O campo microscópico mostra um espaço porta (EP) e uma veia central (VC). Hematoxilina e eosina, 100X. B-aspecto microscópico do fígado com 3 semanas após a ligadura do ducto biliar. Observar a subversão da arquitetura pela formação de nódulos (n) de hepatócitos separados por septos fibrosos (setas). Hematoxilina e eosina, 100X. C- Mesmo fígado mostrado em B, corado pelo picro-sírius que destaca o colágeno em vermelho (setas pontilhadas), ficando mais evidente a intensa proliferação dos ductos biliares que não apresentam dilatação da luz (setas brancas). Picro-sírius, 100X. D- detalhe em maior aumento da Figura C mostrando os ductos biliares proliferados (setas brancas) envolvidos por fibras colágenas (setas pontilhadas). O aspecto foi semelhante nos grupos com ligadura biliar, desnervados ou não e tratados ou não com aspirina.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a influência do tomboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ) sobre a natriurese e diurese em ratos com cirrose experimental secundária à ligadura dos ductos biliares. Utilizando-se da aspirina, um antiinflamatório não esteroidal (AINE), que inativa a ciclooxigenase, atuando principalmente sobre a COX-1, inativa irreversivelmente a ciclooxigenase plaquetária, foi possível verificar o grau de envolvimento do  $TxA_2$  no quadro evolutivo que acompanha a extensa desorganização da arquitetura lobular hepática. Como pode ser observado nos nossos resultados, três semanas de ligadura dos ductos biliares nos ratos produziu um quadro histológico que mostrou proliferação biliar intensa, invadindo o lóbulo hepático, isolando nódulos de hepatócitos, caracterizando a cirrose biliar. O quadro de cirrose era complementado pela observação de ascite na maioria dos animais.

Estudos anteriores ao nosso demonstraram que ratos com cirrose experimental, por meio da ligadura dos ductos biliares, desenvolveram hipotensão arterial e diminuição da resistência vascular sistêmica, indicando que a atividade vascular do NO encontra-se aumentada na cirrose com ou sem ascite, o que sugere que o NO pode estar envolvido na patogênese da síndrome vasodilatadora presente na doença (Ros e cols., 1995, Clària e cols., 1992). Além disso, no estudo realizado por Lieming e colaboradores (2000) foi observado que quando provocada à inibição do NOS neuronal com 7-nitroindazole aboliu o efeito hipotensor dos ratos cirróticos induzida por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) demonstrando a importância do NO na fisiopatologia da cirrose. Em nossos resultados também foi encontrada hipotensão arterial leve em ratos com cirrose secundária a ligadura do ducto biliar que foram tratados ou não com aspirina; desnervados e que receberam ou não tratamento com aspirina, evidenciando que a inibição do  $TxA_2$  e a desnervação não foram capazes de influenciar na pressão arterial desses animais. Esses resultados nos levam a concordar com as conclusões prévias de diversas pesquisas que a hipotensão arterial observada na cirrose hepática acontece devido ao aumento na produção vascular de NO que leva a vasodilatação arterial periférica (Pizcueta e cols., 1992, Ros e cols., 1995, Niederberger e cols., 1995, Garcia-Estañ e cols., 1994).

Na função renal, a ligadura dos ductos biliares, promoveu o aumento no volume de urina e na excreção diária de sódio em animais cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina por 3 semanas quando comparados aos grupos de animais controles que receberam ou não tratamento com aspirina, porém quando foi feita a comparação entre os grupos de ratos cirróticos tratados com aspirina com o não tratado com aspirina não houve diferença significativa da diurese e natriurese entre os grupos. O aumento na diurese e natriurese foram acompanhados de aumento da ingestão de água por esses ratos. Através da análise desses resultados, pode-se sugerir que o aumento na diurese e natriurese nos animais cirróticos não foi provocada pela inibição do  $\text{TxA}_2$ . O aumento da diurese após desenvolvimento deste modelo de cirrose experimental é devido à possibilidade de fenômenos adaptativos que podem enfraquecer os mecanismos de reabsorção de água no tubo coletor pela ação da vasopressina nos receptores  $V_2$ , um mecanismo alternativo a partir do momento em que o quadro de cirrose encontra-se totalmente instalado com expansão de volume extracelular sendo capaz de suprimir a ação hormonal da vasopressina, promovendo maior excreção de água por esses animais. Muito embora existam evidências científicas que mostram que os níveis plasmáticos de vasopressina estão aumentados em pacientes e ratos com cirrose durante o desenvolvimento do quadro de cirrose o que contribui para o desenvolvimento de hiponatremia dilucional, hipoosmolalidade, produção de urina hiperosmótica e quadro circulatório hiperdinâmico como consequência da retenção renal de água (Bichet e cols., 1982, Claria e cols, 1989; Arroyo e cols 1988, Thomas e cols., 1998, Karl e cols., 1986). Já o aumento da natriurese nos animais cirróticos, nos leva a sugerir que no momento em que o processo de instalação da cirrose se completa ocorre redução dos mecanismos vasoconstritores e retentores de sódio e água, como o sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina e vasopressina, e na ativação de mecanismos vasodilatadores como o NO, prostaglandinas renais e peptídeo natriurético atrial. Entretanto, existem evidências na literatura mostrando que as anormalidades circulatórias e os mecanismos de controle do volume extracelular na cirrose hepática promovem respostas no sistema neurohumoral capazes de influenciar a função renal como na produção de retenção de água e sódio através do sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, das prostaglandinas e vasopressina (DiBona e cols, 1988, DiBona e

cols 1983, Koepke e cols., 1987, Solis-Herruzo e cols., 1987, Willett e cols., 1985). Existem estudos que sugerem que o aumento da atividade eferente do nervo simpático renal em animais e em pacientes com cirrose hepática contribui para retenção de água e sódio e formação de edema, durante o completo desenvolvimento da doença, demonstrando que o aumento na atividade simpática eferente do nervo renal na cirrose experimental foi capaz de aumentar a reabsorção tubular de água e sódio (DiBona e cols., 1983; Henriksen e cols., 1984, Koepke e cols., 1987). Entretanto, a partir do momento em que o quadro da cirrose encontra-se instalado, com expansão volêmica, sugerimos que a tendência é a ocorrência de aumento na excreção hidrossalina como observado nos resultados.

Quando promovemos a prévia desnervação simpática renal bilateral dos ratos com cirrose secundária à ligadura do ducto biliar que receberam ou não tratamento com aspirina observa-se que houve aumento na diurese e natriurese dos mesmos quando comparados aos seus respectivos grupo de ratos submetidos à ligadura do ducto biliar que receberam ou não tratamento com aspirina. Já quando foi feita a comparação dos animais submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnervação tratado com aspirina com os animais submetidos à ligadura do ducto biliar e a desnervação que não receberam tratamento com aspirina não houve diferença significativa na excreção diária de urina e sódio. Através da análise desses resultados, podemos sugerir que a inibição do  $\text{TxA}_2$  não modificou a diurese e natriurese dos animais cirróticos e desnervados. A atividade simpática renal foi quem se mostrou ser um dos mecanismos envolvidos na retenção de água e sódio na cirrose experimental, já que a prévia desnervação renal bilateral contribuiu para a diurese e natriurese dos animais que foram submetidos à ligadura do ducto biliar e desnervados tratados ou não. Sugerimos que na cirrose hepática mesmo o nervo simpático renal tendo um papel fundamental na retenção de água e sódio durante o desenvolvimento do quadro da cirrose experimental, no momento em que a mesma está instalada ocorrem mecanismos de adaptação neuro-humoral que levam a redução do mesmo conforme relatado acima, mas que não é completamente suprimido, pois a desnervação renal bilateral prévia foi capaz de aumentar a excreção diária de água e sódio nos animais com cirrose experimental.

Na avaliação da excreção diária de sódio em ratos dos grupos controle que receberam ou não tratamento com aspirina durante 3 semanas observamos que a capacidade de excreção de sódio mostrou-se menor nos animais que receberam tratamento com aspirina quando comparados com os animais controle que não receberam tratamento com aspirina. Para esse resultado já existem evidências bem estabelecidas na literatura demonstrando que os AINES interferem na produção local e com a ação das prostaglandinas no rim. A inibição da COX por antiinflamatórios não esteroidais promove a retenção de sódio e água via múltiplos mecanismos. As prostaglandinas promovem a excreção de sódio por aumentar o fluxo plasmático renal e inibir o transporte no ramo ascendente espesso (RAE) e néfron distal. Dessa forma, o bloqueio na produção destes moduladores pelos AINES resulta no decréscimo do fluxo plasmático renal e aumento na reabsorção de NaCl no RAE (Smith., 1992; Clive e Stoff., 1984; Schlondorff, 1993).

Embora os tratamentos desnervação ou administração da aspirina, isolados ou associados aparentemente não tenham interferido no quadro histológico da cirrose, a mortalidade foi menor e, quando ocorreu, foi mais tardia no grupo cirrótico experimental que recebeu desnervação e tratamento com aspirina. Isso sugere que durante o próprio desenvolvimento do quadro da doença que é acompanhada pela queda da resistência vascular ocorre ativação compensatória do sistema nervoso simpático e sistema renina- angiotensina- aldosterona e a liberação não-osmótica da vasopressina resultando em uma circulação hiperdinâmica com aumento do débito cardíaco, diminuição da resistência vascular sistêmica, hipotensão e vasoconstricção renal. Isso pode contribuir para o aumento de vasoconstritores renais e diminuição da vasodilatadores renais, o que provavelmente pode favorecer o aumento da taxa de mortalidade dos animais com cirrose secundária à ligadura do ducto biliar. (Schrier e cols., 1988; Murray e cols., 1958; Kowalski e cols., 1953; Fernandez-Seara e cols., 1989).

No sentido de se avaliar o papel do tromboxano  $A_2$  na resposta renal à sobrecarga hidrossalina em ratos com cirrose experimental secundária à ligadura dos ductos biliares que receberam ou não tratamento com aspirina durante 3 semanas, observa-se que a capacidade de excreção renal de sódio e água em resposta a sobrecarga de volume nos animais cirróticos que receberam ou não tratamento com aspirina foi

similar. Entretanto, quando comparados aos animais controle receberam ou não tratamento com aspirina essa resposta mostrou-se menor. Dentre o mecanismo proposto, o papel do tromboxano  $A_2$  foi objeto de nosso estudo. Neste sentido, a similaridade das respostas entre os animais tratados ou não com aspirina nos leva a acreditar que o mesmo não tem participação decisiva na menor excreção hidrossalina em resposta a sobrecarga de volume na cirrose. Quando avaliamos o papel dos nervos simpáticos renais os resultados nos sugerem que mesmo que durante o processo de instalação da cirrose ocorra uma maior ativação do sistema simpático renal quando a doença encontra-se completamente instalada, ou seja, com volume extracelular expandido, a atividade simpática renal atenua-se o que culmina com uma menor retirada simpática renal quando há expansão volêmica. Esta interpretação é ainda sustentada pelo fato de a desnervação renal bilateral prévia não ter sido capaz de alterar o prejuízo causado na diurese e natriurese em resposta a sobrecarga hidrossalina, nos animais com cirrose experimental que receberam ou não tratamento com aspirina. Apesar de já está bem estabelecido que em condições fisiológicas, as expansões volêmicas promovem aumento na excreção hidrossalina, a qual acredita-se ser de origem multifatorial, já que a dilatação das câmaras atriais e ventriculares que decorre da expansão volêmica culminado em supressão de mecanismos sistêmicos vasoconstritores e retentores de sódio e água, como o sistema nervoso simpático, o sistema renina- angiotensina e a vasopressina e na ativação de mecanismos vasodilatadores como os do peptídeo natriurético e das prostaglandinas (Brennan e cols., 1971; Goetz e cols., 1975; Thames e cols., 1982).

Dessa forma, podemos inferir que outros mecanismos que não tromboxano ou sistema nervoso simpático renal podem estar envolvidos na menor excreção hidrossalina frente à expansão volêmica observada nos animais cirróticos. Apesar de existirem evidências na literatura de que os níveis de tromboxano  $A_2$  intrarrenais encontram-se aumentados na cirrose (Zipser e cols., 1983; Ohara e cols., 1993; Zipprich e cols., 1990). Baseados nos estudos de López- Novoa e colaboradores (1984) sugerimos que três fatores poderiam estar envolvidos na ausência adequada da diurese e natriurese após moderada expansão de volume extracelular em ratos com cirrose. Primeiro, a infusão de salina isotônica induz diferente estágio de expansão de volume extracelular em ratos cirróticos, pois há evidência de

extravasamento protéico revelada por uma maior distribuição da albumina em ratos com cirrose do que em ratos controle. Mudanças no total de proteínas plasmática no período posterior a expansão sugere manutenção do fluxo intravascular para o fluxo extravascular, provavelmente favorecido pelo aumento da pressão oncótica intersticial. Segundo, a taxa de filtração de um único néfron reduzida em condições basais e ausência da redistribuição da taxa de filtração glomerular intrarrenal após a expansão de volume em ratos cirróticos podem ter um papel na retenção de sódio e água. Terceiro, diferenças na capacidade de reabsorção tubular podem ser importantes fatores que levam a menor resposta natriurética e diurética à expansão de volume em ratos cirróticos.

Nossos resultados também demonstraram que ratos controle desnervados e tratado com aspirina apresentaram maior excreção hidrossalina durante a expansão de volume quando comparados aos ratos desnervados que não receberam tratamento com aspirina. Isso mostra que a inibição do tromboxano  $A_2$  parece influenciar na diurese e natriurese. Existem evidências na literatura que admitem estes resultados, como o estudo realizado por Papanicolaou e colaboradores (1985) que mostrou que a inibição do tromboxano síntase promovida pelo imidazol, numa dose que não diminui a síntese dos outros prostanóides, aumenta significativamente a razão de excreção de sódio em ratos normais. Já é bem conhecido que o tromboxano  $A_2$  desempenha um papel fundamental na função renal em condições fisiológicas, causando vasoconstrição e contração dos podócitos, resultando em decréscimo do fluxo sanguíneo renal, filtração glomerular e pressão de perfusão (Clive e cols., 1984; Smith, 1992; Schneider cols., 1998).

## 7. REFERÊNCIAS

Andrews WHH, Palmer JF (1967). Afferent neurons discharge from canine liver. Quarterly Journal Experimental Physiology and Cognato Medical Sciences, 52:269-279.

Arima S, Ren Y, Juncos LA, Carretero OA and Ito S (1994). Glomerular prostaglandins modulate vascular reactivity of the downstream efferent arterioles. Kidney Ineternational, 45: 650-658.

Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Schrier RW, Rodés J (1988). Pathophysiology of ascites and functional renal failure in cirrhosis. Journal of Hepatology, 6 :239-257.

Arroyo V, Gines P, Rimola A, Gaya J (1986). Renal function abnormalities, prostaglandins, and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cirrhosis with ascites. An overview with emphasis on pathogenesis. The American Journal of Medicine, 81: 104-122.

Banks RO (1988). Vasoconstrictor-induced changes in renal blood flow: role of prostaglandins and histamine. The American Journal of Physiology, 254: F470-F476.

Bell-Quilley CP, Lin YSR, Hilchey SD, Drugge ED, and McGiff JC (1993). Renovascular actions of angiotensin II in the isolated kidney of the rat: Relationship to lipoxygenases. The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics, 267: 676-682.

Bennett WM, Henrich WL, Stoff JS (1996): The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Summary and recommendations. The American Journal Kidney Diseases, 28(Suppl): S56-S62.



Bichet D, Szatalowicz V, Chaimovitz C, Schrier RW (1982). Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients. *Annals of Internal Medicine*, 96:413-417.

Black SC, Brideau C, Cirino M (1998): Differential effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor versus indomethacin on renal blood flow in conscious volume-depleted dogs. *The Journal Cardiovascular Pharmacology*, 32: 686-694.

Bonvalet JP, Pradelles P, and Farman N (1987). Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *The American Journal of Physiology*, 253:F377-F387.

Brannstrom K and Arendshorst WJ (1999). Thromboxane A<sub>2</sub> contributes to the enhanced tubuloglomerular feedback activity in young SHR. *The American Journal of Physiology*, 276: F758-F766.

Brännström K and Arendshorst WJ (1999). Resetting of exaggerated tubuloglomerular feedback activity in acutely volume-expanded young SHR. *The American Journal of Physiology*, 276: F409-F416.

Brater DC (1999). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: focus on cyclooxygenase-2-selective inhibition. *The American Journal of Medicine*, 107: 65S-70S.

Brennan LA Jr, Malvin RL, Jochim KE, Roberts DE (1971). Influence of right and left atrial receptors on plasma concentrations of ADH and renin. *The American Journal of Physiology*, 221:273-278.

Breyer MD, Zhang YH, Guan YF, Hao CM, Hebert RL, and Breyer RM (1988). Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney International*, 54: S88-S94.

Breyer M, Davis L, Jacobson H and Breyer RM (1996). Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *The American Journal of Physiology*, 270: F912-F918.

Bunting S, Moncada S and Vane JR (1983). The prostacyclin- thromboxane A<sub>2</sub> balance: pathophysiological and therapeutic implications. *British Medical Buletin*, 39: 271-276.

Campbell V, Greig PD, Crawford J (1982). A comparasion of acute reversible pre- and postsinusoidal portal hypertension on sodium and water retention in the dog. *Hepatology*, 2:54.

Chatziantoniou C, and Arendshorst WJ (1992). Prostaglandin interactions with angiotensin, norepinephrine and tromboxane in rat renal vasculature. *The American Journal of Physiology*, 262: F68-F76.

Claria J, Jiménez W, Arroyo V, Guarner F, López C, La Villa G, Asbert M, Rivera F, Rodés J (1989). Blockade of the hydroosmotic effect of vasopressin normalizes water excretion in cirrhotic rats. *Gatroenterological*, 97(5):1294-1299.

Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA (1991). Suppression of thromboxane A<sub>2</sub> but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *The New Engand Journal of Medicine*, 325: 1137-1141.

Clària J, Jiménez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, Rodés J (1992). Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology*, 15: 343–349.

Clive DM, Stoff JS (1984). Renal syndromes associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The New England Journal of Mecina*, 310: 563-572

Currie MG, Needleman P (1984). Renal arachidonic acid metabolism. *Annual Review Physioogyl*, 46: 327-341.

DiBona GF and Sawin LL (1983). Renal nerves in renal adaptation to dietary sodium retriCTION. *The American Journal of Physiology*, 245: F322-F328.

DiBona GF (1984). Renal neural activity in hepatorenal syndrome. *Kidney International*, 25:841-853.

DiBona GF (1985). Neural control of renal function. *Federation Proceedings*, 44: 2815-2850.

DiBona GF (1985). Neural control of renal function: role of renal alpha adrenoceptors. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, 8:18-23.

DiBona GF and Sawin LL (1985). Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *The American Journal of Physiology*, 248:15-23.

DiBona GF (1986). Neural mechanisms in body fluid homeostasis. *Federation Proceedings*, 45: 2871-2877.

DiBona GF (1986). Prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Effects on renal hemodynamics. *The American Journal of Medicine*, 80: 12-22.

DiBona GF, Herman PJ, Sawin LL (1988). Neural control of renal function in edema-forming states. *The American Journal of Physiology*, 254: 17-24.

DiBona GF (1989). Neural control of renal function: cardiovascular implications. *Hypertension*, 13:539-548.

DiBona GF, Sawin LL (1991). Role of renal nerves in sodium retention of cirrhosis and congestive heart failure. *The American Journal of Physiology*, 260: R298- R305.

DiBona GF and Sawin LL (1995). Hepatorenal baroreflex in cirrhotic rats. *The American Journal of Physiology and Gastrointest Liver Physiology*, 269:G29-G33.

Fan JG, Zheng XY, Tian LY, Qian Y, Ding XD, Xu ZJ (2004). Dynamic changes of plasma levels of prostacycline and thromboxane A2 and their correlation with the severity of hepatic injury in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 12:681-683.

Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J, Zozaya JM, Cobos MA, Rodriguez-Eire JL, Garcia-Plaza A, Leal J (1989). Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology*, 97: 1304-1312

Frame MH and Hedqvist P. Evidence for prostaglandins mediated prejunctional control of renal sympathetic transmitter release and vascular tone (1975). *British Journal Pharmacology*, 54:189-196.

Francisco L, Osborn J, and Dibona G (1982). Prostaglandins in renin release during sodium deprivation. *The American Journal of Physiology Renal*, 243: F537-F542.

Franco F, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. Portal hypertension after duct obstruction( 1979). Effect of bile diversion on portal pressure in the rat. *Archives of Surgery*, 114: 1064.

Forrest EH , Jones AL, Dilloin JF, Hayes PC (1995). The effect of nitric oxide synthase inhibition on portal pressure and azygous blood flow in patients with cirrhosis. *Journal Hepatology* 23:254-258.

García-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, Romero JC (1994). Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. *The American Journal of Physiology* 267:R549-R553.

Gellai M, Valtin H (1979). Chronic vascular constrictions and measurements of renal function in conscious rats. *Kidney International*, 15: 419-426.

Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Raggi VC (1999). Pathogenic factors and clinical elements in ascites and hepatorenal syndrome during liver cirrhosis. *Annual Review Medicine International*. 14 (4): 264-84.

Goetz KL, Bond GC, Bloxham DD (1975). Atrial receptors and renal function. *Physiological Reviews*, 55:157-205.

González JD, Llinás MT, Nava E, Ghiadoni L, Salazar FJ. Role of nitric oxide and prostaglandins in the long-term control of renal function. *Hypertension*, 32: 33-38, 1998.

Grone HJ, Grippo RS, Arendshorst WJ and Dunn MJ. Role of thromboxane in control of arterial pressure and renal function in young spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology*, 250: F488-F496, 1986.

Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Moucada S (1993). Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*, 18:1139-1143.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN (1994). Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *The Journal of Clinical Investigation*, 94: 2504-2510.

Hayes PC, Cumming AD, Craig KJ, Watson M, Bouchier LA (1992). Portal and systemic hemodynamics and humoral factors in cirrhosis with and without ascites. *American Journal Gastroenterol*, 87 (10): 1433-8.

Hennekens CH, Dyken ML, Fuster V (1997). Aspirin as therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation*, 96: 2751-2753.

Henriksen JH, Ring-Larsen H, Kanstrup IL, Christensen NJ (1984). Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with decompensated cirrhosis. *Gut*, 25: 1034-1043.

Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S (1991). Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature*, 349: 617-620.

Hofbauer KG, Mah SC, Opperman JR (1986). Chronic blockade of vasopressin receptors in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 7:S56-60.

Huang CL, Lewicki J, Johnson LK, Cogan MG (1985). Renal mechanism of action of rat atrial natriuretic factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 75:769-773.

Imig JD, Kitiyakara C, and Wilcox CS (2000). Arachidonate metabolites In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Seldin DE, and Giebish G.. New York: Lippincott Williams & Wilkens, 875-889.

Katholi RE, Oparil S, Urthaler F, James TN (1979). Mechanism of postarrhythmic renal vasoconstriction in the anesthetized dog. *The Journal of Clinical Investigation*, 64:17-31.

Koepke JP, Jones S, DiBona GF (1987). Renal nerves mediate blunted natriuresis to atrial natriuretic peptide in cirrhotic rats. *The American Journal of Physiology*, 252:R1019-1023.

Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW and Nusing RM (1997). Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *The American Journal of Physiology*, 272: F460-F468.

Kostreva DR, Castaner A, Kampine JP (1980). Reflex effects of hepatic baroreceptors on renal and cardiac sympathetic nerve activity. *The American Journal of Physiology*, 238:R390.

KOWALSKI HJ, ABELMANN WH (1953). The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 32:1025-1033.

Levy M (1974). Renal function in dogs with acute selective hepatic venous outflow block. *The American Journal of Physiology* 227: 1074.

Levy M, Wexler MJ (1987). Sodium excretion in dogs with low-grade caval constriction: Role of hepatic nerves. *The American Journal of Physiology*, 253:

Laffi G, Marra F, Carloni V, Azzena G, De Feo ML, Pinzani M, Tosti-Guerra C, Gentilini P (1992). Thromboxane-receptor blockade increases water diuresis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology*. 103:1017-1021.

Lieming Xu, Ethan P. Carter, Mamiko Ohara, Pierre-Yves Martin, Boris Rogachev, Kenneth Morris, Melissa Cadnapaphornchai, Mladen Knotek , Robert W. Schrier (2000). Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis The American Journal of Physiology Renal Physiology, 279:1110-1115

Llinás MR, Rodriguez F, Moreno C and Salazar FJ (2000). Role of cyclooxygenase-2-derived metabolites and nitric oxide in regulating renal function. The American Journal of Physiology, 279: R1641-R1646.

Llinás MT, González JD, Nava E, and Salazar FJ (1997). Role of angiotensin II in the renal effects induced by nitric oxide and prostaglandin synthesis inhibition. Journal American Society Nephrology, 8: 543-550.

Lopez-Novoa JM, Martinez-Maldonado M (1982). Impaired renal response to splachnic infusion of hypertonic saline in conscious cirrhotic rats. The American Journal of Physiology, 242:F390.

López-Novoa JM, Santos JC, Caramelo C, Fernandez-Muñoz D, Blanchart A, Hernando L (1984). Mechanisms of the impaired diuretic and natriuretic responses to a sustained and moderate saline infusion in rats with experimental cirrhosis Hepatology, 4:419-423.

Martin PY , Schrier RW (1997). Pathogenesis of Water and sodium retention in cirrhosis. Kidney International Supplement, 59: S 43-9.

McGiff JC and Quilley J (1999). 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. The American Journal of Physiology, 277: R607-R623.

Millard-Sadler GH, Wright R (1979). Cirrhosis: Na appraisal. In Wright R, Albeti KGMM, Karran S, et al. (eds): Liver and Biliary Disease. WB Saunders, Philadelphia, p 688.

Mitchell GA (1950). The nerve supply of the kidneys. Acta Anatomica, 10:1-37.

Moncada S, Ferreira SH, Vane JR (1978). Pain and inflammatory mediators. In, inflammation. Handbook of Experimental Pharmacology, 50-1: 588-616.

Moore K (1997). The hepatorenal syndrome. Clinical Science (London, England), 92:433.

Morita H, Vatner SF (1985). Effects of volume expansion on renal nerve activity, renal blood flow and sodium and water excretion in conscious dog. The American Journal of Physiology, 249: F680-F687.

Murray MD, Brater DC (1993): Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Annual Review Pharmacology Toxicology, 33: 435-465.

MURRAY JF, DAWSON AM, SHERLOCK S (1958). Circulatory changes in chronic liver disease. The American Journal of Medicine, 24: 358-367.

Naccarato R, Messa P, D' Angelo A (1981). Renal handling of sodium and water in early chronic liver disease. Evidence for a reduced natriuretic activity of the cirrhotic urinary extracts in rats. Gastroenterology, 81:205.

Nakahata N, Matsuoka I, Ono T, Nakanishi H (1989). Thromboxane A<sub>2</sub> activates phospholipase C in astrocytoma cells via pertussis toxin-insensitive G-protein. European Journal of Pharmacology, 162: 407-417.

Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD (1996). Paracrine regulation of the renal microcirculation. Physiological Reviews, 76: 425-536.

Niederberger M, Martin PY, Gine's P, Morris K, Tsai P, Xu DL, McMurtry I, Schrier RW (1995). Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. Gastroenterology, 109: 1624– 1630.

Niijima, A (1977). Afferent discharges from venous pressoreceptors in liver. The American Journal of Physiology, 232:C76.



Ohara N, Voelkel NF, Chang SW (1993). Tissue eicosanoids and vascular permeability in rats with chronic biliary obstruction. *Hepatology*, 18: 111–118.

Palmer BF, Henrich WL (1995). Clinical acute renal failure with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Seminars in Nephrology*, 153: 214-27.

Papadakis MA, Arieff AI (1987). Unpredictability of clinical evaluation of renal function in cirrhosis. Prospective study. *The American Journal of Medicine*, 82:945.

Papanicolaou N, Gkika EI, Gkikas G, Bariety J (1985). Selective inhibition of renal thromboxane biosynthesis increased sodium excretion rate in normal and saline-loaded rats. *Clinical Science (London)*, 68(1): 79-82.

Patel KP (1991). Role of renal nerves and vasopressin in renal responses to acute volume expansion in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196:438-443.

Pawar D, Shahani S, Maroli S (1998). Aspirin- the novel antiplatelet drug. *Hong Kong Medical Journal*, 4: 415-418.

Pedersen AK, FitzGerald GA (1984). Dose-related Kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *The New England Journal Medicine*, 311: 1206-1211.

Pena JC (1995). Renal and extra-renal mechanisms of sodium and water retention in cirrhosis with ascites. *Revista de Investigación Clínica*, 47 (1): 63-79.

Peterson TV, Benjamin BA, Hurst NL (1988). Renal nerves and renal responses to volume expansion in conscious monkeys. *The American Journal of Physiology*, 255:388-394.

Pick J (1970). *The autonomic nervous system*. JB Lippincott, Philadelphia, p 324.

Pizcueta P, Piqué JM, Fernández M, Bosch J, Rodés J, Whittle BJ, Moncada S (1992). Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology*, 103:1095-1104.

Range HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. 4<sup>a</sup> ed. London: Hartcourt Brace and Company Limited, 1999.

Recordati GM, Moss NG, Genovesi S, Rogenes PR. (1980). Renal receptors in the rat sensitive to chemical alterations of their environment. *Circulation Research*, 46:395-405.

Reid IA (1992). Interactions between ANG II, sympathetic nervous system and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *The American Journal of Physiology*, 262: E 763- E778.

Rogenes PR and Gottschalk CW (1982). Renal function in conscious rats with chronic unilateral renal denervation, *The American Journal of Physiology*, 242: F140-F148.

Ros J, Claria J, Jimenez W, Bosch-Marce M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, Rodés J (1995). Role of nitric and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. *Hepatology*, 22(3): 915-920.

Ros J, Jiménez W, Lamas S, Clària J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J (1995). Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 21: 554–560.

Salerno F, Lorenzano E, Maggi A, Badalamenti S, Minuz P, Degan M, Chinea B, Scotti A (1993). Effects of imidazole-salicylate on renal function and the diuretic action of furosemide in cirrhotic patients with ascites. *Journal Hepatology*, 19:279-284.

Schlondorff D (1993). Renal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney International*, 44: 643-653.

Schlondorff D and Ardaillou R (1986). Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney International*, 29:108-119.

Schneider A, Stahl RAK (1998). Cyclooxygenase-2 (COX-2) and the kidney: current status and potential perspectives. *Nephrol Dial Transplant*, 13:10-12.

Schneider E, McLane-vega L, Hanson R (1978). Effect of chronic bilateral renal denervation on daily sodium excretion in the conscious dog. *Fed Proc*, 37: 645-652.

Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J (1988). Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*, 8:1151-1157.

Schwab TR, Edwards BS, Heublein DM, Burnett JC Jr (1986). Role of atrial natriuretic peptide in volume-expansion natriuresis. *The American Journal of Physiology*, 251:10-13.

Silldorff EP, Hilbun LR, Pallone TL (2002). Angiotensin II constriction of rat vasa recta is partially thromboxane dependent. *Hypertension*, 40:541.

Smith WL (1992). Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *The American Journal of Physiology*, 263: F181-F191.

Solis-Herruzo JA, Duran A, Favela V, Castellano G, Madrid JL, Muñoz-Yagüe MT, Morillas JD, Estenoz J (1987). Effects of lumbar sympathetic block on kidney function in cirrhotic patients with hepatorenal syndrome. *Journal Hepatology*, 5:167-173.

Szalay L, Colindres RE, Jackson R, Gottschalk CW (1986). Effects of chronic renal denervation in conscious restrained rats. *International Urology and Nephrology*, 18:3-18.

Thames MD, Miller BD, Abboud FM (1982). Baroreflex regulation of renal nerve activity during volume expansion. *The American Journal of Physiology*, 243: 810-814.

Thomas E. N. Jonassen, Søren Nielsen, Sten Christensen and Jørgen Søberg Petersen (1998). Decreased vasopressin-mediated renal water reabsorption in rats with compensated liver cirrhosis. *The American Journal Renal Physiology*, 275:216-225.

Tyree H. Kiser, Douglas N. Fish, Marilee D. Obritsch, Rose Jung, Robert MacLaren, Chirag R. Parikh (2005). Vasopressin, not octreotide, may be beneficial in the treatment of hepatorenal syndrome: a retrospective study. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1813–1820.

Unikowsky B, Wexler MJ, Levy M (1983). Dogs with experimental cirrhosis of the liver but without intrahepatic hypertension do not retain sodium or form ascites. *The Journal Clinical Investigation* 72:1594.

Vatner SF, Higgins CB, White S, Patrick T, Franklin D (1971). The peripheral vascular response to severe exercise in untethered dogs before and after complete heart block. *The Journal of Clinical Investigation* 50:1950-1960.

Voigt MD, Jones SY, DiBona GF (1999). Role of angiotensin in renal sympathetic activation in cirrhosis rats. *The American Journal of Physiology*, 277: F245-F250.

Weksler Bbb, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P, Subramanian V, Tack-Goldman K and Gay WA (1983). Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *The New England Journal Medicine*, 308: 800-805.

Wernze H, Tittor W, and Goerig M (1986). Release of prostanoids into the portal and hepatic vein in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 6: 911–916.

Willett I, Esler M, Burke F, Leonard P, Dudley F (1985). Total and renal sympathetic nervous system activity in alcoholic cirrhosis. *Journal Hepatology* 1:639-648.

Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs J (1998). Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *American Journal of Physiology*, 274: F481-F489.

Yokoyama Y, Xu H, Kresge N, Keller S, Sarmadi AH, Baveja R, Clemens MG, Zhang JX (2003). Role of thromboxane A<sub>2</sub> in early BDL-induced portal hypertension. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 284: G453-460

Zambraski EJ, DiBona (1996). Renal sympathetic nervous system in hepatic cirrhosis. In: *The Kidney in liver disease*, edited by M Epstein. Philadelphia, PA: Hanley & Belfus, p. 405-421.

Zipprich B, Gerhardt C, Giessler C, Taube C, Rath FW, Mest HJ, Nilius R (1990). Prostacyclin and thromboxane synthesis in liver tissue in chronic liver diseases. *Zeitschrift Medizinische Laboratoriums Diagnostik* 31: 299–304.

Zipser RD, Radvan GH, Kronborg IJ, Duke R, Little TE (1983). Urinary thromboxane A<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> in the hepatorenal syndrome: evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology*, 84: 697-703.